

HAMILTON, BROOK, SMITH & REYNOLDS, P.C.

**PRIORITY CLAIM
UNDER 35 U.S.C.
§119 or 365**

Attorney Docket No.	3462.1004-000	Group	1645
First Named Inventor	Ryoichi Hashida		
Application No.:	10/611,310	Filed:	July 1, 2003
Examiner	Not Assigned	Conf. No.	3981

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

on 6-16-04

Date

Dawn M Myers

Signature

Dawn M Myers

Typed or printed name of person signing certificate

Title of
Invention

METHODS FOR EXAMINATION FOR ALLERGIC DISEASES, AND DRUGS FOR
TREATING ALLERGIC DISEASES

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

This application claims priority under 35 U.S.C. §119 or 365 to the foreign/international application(s) identified below:

			Certified Copy Enclosed?	
<u>2002-193841</u>	<u>Japan</u>	<u>July 2, 2002</u>	<input checked="" type="checkbox"/> [X]	<input type="checkbox"/> []
Application No.	Country	Filing Date	Yes	No
<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<input type="checkbox"/> []	<input type="checkbox"/> []
Application No.	Country	Filing Date	Yes	No
<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<input type="checkbox"/> []	<input type="checkbox"/> []
Application No.	Country	Filing Date	Yes	No
<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<input type="checkbox"/> []	<input type="checkbox"/> []
Application No.	Country	Filing Date	Yes	No

☐ [] A certified copy of the priority document, [country] Application No. [], filed [], was previously filed in the parent application, U.S. Application No. [], filed [].

Respectfully submitted,

HAMILTON, BROOK, SMITH & REYNOLDS, P.C.

By Helen Lee
Helen Lee
Registration No. 39,270
Telephone (978) 341-0036
Facsimile (978) 341-0136

Concord, Massachusetts 01742-9133

Dated: June 16, 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

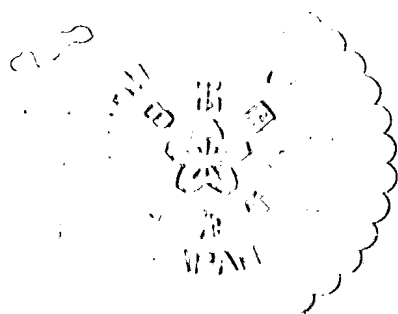
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 2 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 1 9 3 8 4 1
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 1 9 3 8 4 1]

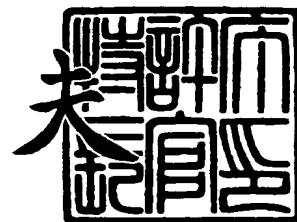
出 願 人
Applicant(s): 株式会社ジェノックス創薬研究所
 国立成育医療センター総長



2 0 0 3 年 8 月 2 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 7 0 3 9 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 G1-A0211

【提出日】 平成14年 7月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 橋田 亮一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 加賀谷 伸治

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 杉田 雄二

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1 国立成育医療センター研究所内

【氏名】 斎藤 博久

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5 - 1 - 1 国立がんセンター研究所内

【氏名】 大倉 永也

【特許出願人】

【識別番号】 597177471

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1

【氏名又は名称】 国立成育医療センター

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アレルギー性疾患の検査方法、および治療のための薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法。

(a) 被検者の好酸球細胞における、TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

【請求項 2】 遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 または 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】 TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

【請求項 5】 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(1) 下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(a) TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b) TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(2) 前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

【請求項 6】 細胞が株化白血球細胞である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が下記 (a)

）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

（a）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（b）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（1）被検動物に候補化合物を投与する工程、および

（2）被検動物の好酸球細胞における前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

【請求項8】 請求項5～7のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項9】 次の工程（1）および（2）を含む、候補化合物がTR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

（1）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および

（2）前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、

【請求項10】 請求項9に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項11】 次の工程（1）～（3）を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法。

（1）TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程

(2) TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程

(3) TR3またはTINUR受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工程

【請求項12】 次の工程(1)～(4)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法。

(1) TR3もしくはTINUR受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得るDNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合するDNA配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有するDNA、を導入した細胞を提供する工程

(2) 前記細胞と被検化合物を接触させる工程

(3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

(4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

【請求項13】 請求項10～12のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬。

【請求項14】 請求項10～12のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬。

【請求項15】 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項13または14に記載の治療薬。

【請求項16】 下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物。

(a) TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b) TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、

アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 1 7】 トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である請求項 1 6 に記載のモデル動物。

【請求項 1 8】 細胞における T R 3 または T I N U R 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法。

【請求項 1 9】 請求項 1 0 ～ 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、請求項 1 8 に記載のアポトーシス誘導方法。

【請求項 2 0】 請求項 1 0 ～ 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アレルギー性疾患に関連する T R 3 または T I N U R 遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺

伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

【0 0 0 3】

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ (DD) 法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライアンおよびパディー (Liang and Pardee) によって 1992 年に最初に開発された (Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1 回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

【0 0 0 4】

さて、現在アレルギー性疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的 IgE 測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的 IgE の存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的な IgE を検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を in vitro で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

【0 0 0 5】

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレ

ルギーの診断に役立てる方法（後者）も公知である。ブリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言えることができる。

【0 0 0 6】

この他、アレルゲンにかかわらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。例えば、血清IgE値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清IgE値は、アレルゲン特異IgEの総量に相当する情報である。アレルゲンの種類にかかわらずIgEの総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgEが低値となる場合がある。

【0 0 0 7】

好酸球数とECP値は、I型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれるタンパク質であるECP(eosinophil cationic protein)も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし、実際に診断の指標とできる範囲は限られている。

【0 0 0 8】

従って、アレルゲンにかかわらず、アレルギー患者の病態の把握や治療方針の決定に役立てることができる診断指標が求められていた。患者に対する危険が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることができるアレルギー性疾患のマーカーは非常に有用である。アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することができれば、該遺伝子の発現を指標とすることにより、アレルギー性疾患の検査が可能となる。さらに、該タンパク質の細胞における機能が解明すれば、その機能に関する知見を基に、アレルギー性疾患の治療方法、および治療のための薬剤の開発が進むものと期待される。

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することにある。さらに、本発明は、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤を提供することを目的とする。

【0010】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは上記課題を解決するために、鋭意研究を行った。一般に好酸球は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床指標とされていることから、本発明者らは、好酸球において発現レベルが変化する遺伝子を単離することができれば、アトピー性皮膚炎に直接的に関与する遺伝子の単離が可能となるものと考えた。

【0011】

まず、本発明者らは、アレルギー性疾患特異的に発現量が異なる遺伝子の同定を試みた。アトピー性皮膚炎患者の種々の病態（軽症、重症ステロイド感受性、重症ステロイド抵抗性）と健常人の末梢血好酸球で発現している遺伝子について、ジーンチップを用いてディファレンシャルな発現比較解析を行った。3倍以上の発現変動のあった遺伝子を選別し、既知遺伝子が主として載っているAチップ遺伝子約12,000個の中から、TR3遺伝子を選択した。健常を含めて各群2例の好酸球RNAをジーンチップにかけ、各症例間2 x 2で4通りの発現比較を行った。TR3は、健常と重症（ステロイド感受性）間の4つすべての組合せにおける発現比較において、いずれも3倍以上変動（重症で亢進）していることが分かった。そこで、よりn数の多いアトピー性皮膚炎患者と健常人の末梢血好酸球パネルで、RT-PCRによる遺伝子の発現定量を行ったところ、健常人<患者というジーンチップで得られた結果が再現した。

TR3は核内オーファン受容体サブファミリーの α タイプとして知られているが、これまでのところ、アレルギー性疾患との関連については報告されていない。

【0012】

さらに本発明者らは、TR3との機能的な類似性が予測される核内オーファン受

容体サブファミリーの β タイプであるTINURについて、TR3と同様に例数が一群10例以上まとまった同じ患者末梢血好酸球パネルを用いて、ABI7700により健常人と患者との発現比較を行った。その結果TINUR遺伝子の発現は、健常に比してアトピー性皮膚炎患者で症例の強弱にはあまりかわりなく有意に亢進することが確認された。TR3同様、これまでのところ、TINUR遺伝子とアレルギー性疾患との関連については報告されていない。

【0013】

アトピー性皮膚炎患者の末梢血好酸球で、アポトーティックな性格が示唆されるような遺伝子の亢進が見られるのは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、TR3またはTINUR遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いものと考えられる。

【0014】

本発明のTR3またはTINUR遺伝子の発現量を指標とすることにより、アレルギー性疾患を検査することが可能である。

【0015】

また、TR3およびTINUR受容体はオーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はこれまでのところ見つかっていなかった。本発明者らは、リガンドの探索のためのハイスループット系を開発し、この系を使用することによりTR3またはTINURの転写活性化作用を有すると考えられる化合物の取得に成功した。該化合物はシクロペンテノン構造を持つプロスタグランジンであり、TR3またはTINUR受容体の生体内リガンドである可能性が考えられた。即ち本発明者らは、アレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。TR3またはTINUR遺伝子の発現を誘導する化合物、あるいはTR3またはTINUR受容体と結合し、転写活性を促進する化合物は、アレルギー性疾患に対する治療効果が期待される。

【0016】

本発明は、アレルギー性疾患時、活性化した好酸球において高い発現を示すTR3またはTINUR遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびア

アレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関し、より具体的には、

〔1〕 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法、

（a）被検者の好酸球細胞における、TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

（b）健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔2〕 遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する、〔1〕に記載の検査方法、

〔3〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕または〔2〕に記載の検査方法、

〔4〕 TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬、

〔5〕 次の工程（1）および（2）を含む、候補化合物が下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

（1）下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

（a）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（b）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（2）前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

〔6〕 細胞が株化白血球細胞である〔5〕に記載の方法、

〔7〕 次の工程（1）および（2）を含む、候補化合物が下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

（a）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

ド、

(b) TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(1) 被検動物に候補化合物を投与する工程、および

(2) 被検動物の好酸球細胞における前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

[8] [5]～[7]のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

[9] 次の工程(1)および(2)を含む、候補化合物がTR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

(1) TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、

[10] [9]に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

[11] 次の工程(1)～(3)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

(1) TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程

(2) TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程

(3) TR3またはTINUR受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工

程

〔12〕 次の工程（１）～（４）を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

（１） TR3 もしくは TINUR 受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得る DNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合する DNA 配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有する DNA、を導入した細胞を提供する工程

（２） 前記細胞と被検化合物を接触させる工程

（３） 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

（４） 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

〔13〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬、

〔14〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンをも有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬、

〔15〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔13〕または〔14〕に記載の治療薬、

〔16〕 下記の（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物、

（a） TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

（b） TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

〔17〕 トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である〔16〕に記載のモデル動物、

〔18〕 細胞におけるTR3またはTINUR受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法、

〔19〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、〔18〕に記載のアポトーシス誘導方法、

〔20〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤、を提供するものである。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、TR3またはTINUR遺伝子が、アトピー性皮膚炎の患者の好酸球において発現量が増加することを見出した。従って、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルを指標することにより、被検者に対してアレルギー性疾患の検査を行うことができる。

【0018】

本発明は、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルを測定することを特徴とする、アレルギー性疾患の検査方法を提供する。

本発明の方法の好ましい態様においては、次の工程を含む。

(a) 被検者の好酸球細胞における、TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

TR3またはTINUR受容体は、3つのサブファミリーを構成する核内オーファン受容体のそれぞれ α 、 β タイプである。表1に示すように核内オーファン受容体は種々の呼び名を持っており、本発明における「TR3遺伝子」、「TINUR遺伝子」とは、必ずしもヒト由来の遺伝子に限定して解されるべきではない。

【0019】

【表 1】

	ヒ ト	マウス	ラット
α	NAK-1(TR3)	nur77	NGFI-B
β	TINUR/NOT	Nurr1	RNR-1
γ	MINOR / CHN	TEC	NOR-1

【0020】

これらTR3またはTINUR受容体タンパク質のアミノ酸配列、およびそれぞれのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に関する情報は、当業者においては公知の各種遺伝子データベース等から容易に取得することができる。具体的には、ヒトTR3受容体タンパク質をコードする遺伝子（TR3遺伝子）の塩基配列を配列番号：1に、ヒトTR3受容体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また、ヒトTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子（TINUR遺伝子）の塩基配列を配列番号：3に、ヒトTINUR受容体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。

【0021】

本発明において、アレルギー性疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

【0022】

代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

【0023】

本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、以下のような検査が含まれる。例えば、被検者がアレルギー性疾患を罹患しているか否かの検査、アレルギー性疾患を被り易い体質か否かの検査、またはアレルギー症状が改善に向かっているかどうかを判断するための検査等が挙げられる。本発明のTR3またはTINUR遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者の活性化した好酸球で発現量の増加を示した。好酸球はアトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーであることから、その減少と関連する臨床マーカーは、治療効果の判定に有用である。より具体的には、TR3またはTINUR遺伝子の発現の上昇は、好酸球の減少を伴ってアレルギー性疾患の改善が進んでいることを示している。

【0024】

アトピー性皮膚炎の重症度と好酸球数は相関しており、好酸球数を積極的に減らすことは治療につながる可能性がある。数の減少に伴って好酸球に特異的に誘導されてくるこの遺伝子を測定するとともに、細胞の外から積極的に誘導するような方法や物質を見つけ出せば、アトピー性皮膚炎の新しい治療法及びそれを評価するための診断法につながる可能性がある。

【0025】

本発明において、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びにタンパク質への翻訳を含む。従って、本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、該遺伝子に対応するmRNAの発現強度、あるいは該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

【0026】

本発明のアレルギー性疾患の検査方法におけるTR3またはTINUR遺伝子の発現レベルの測定は、当業者においては、公知の遺伝子解析方法に従って実施することができる。具体的には、例えばTR3またはTINUR遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

【0027】

本発明のアレルギー性疾患検査用試薬として用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを挙げることができる。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNA の場合は U)、G:C の塩基対からなる 2 本鎖 DNA の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLASTN 等のアルゴリズムにより決定することができる。

【0028】

このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは 15bp～35bp の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも 15bp の鎖長の DNA が用いられる。プライマーとして用いる場合、3' 側の領域は相補的である必要があるが、5' 側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

【0029】

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNA あるいは RNA であることができる。これらポリヌクレオチドは、合成（単離）されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブ DNA は、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・ DNA ポリメラーゼ I を用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・ クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1

987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)

・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg, PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12,7035-7056)

・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

【0030】

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットブロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

【0031】

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象 (DNAもしくはRNAの逆転写産物) にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの 5'-3' エクソヌクレアーゼ (exonuclease) 活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する (Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700 (PEバイオシステムズ社) を用いることができる。

【0032】

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、TR3またはTINUR遺伝子によりコードされるタンパク質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、該遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。

【0033】

この検出に用いるTR3またはTINURタンパク質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40) であることができる。例えば、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

【0034】

TR3またはTINURタンパク質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

【0035】

抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えばTR3またはTINUR遺伝子、もしくはその一部を発現ベクターに組込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、TR3またはTINUR遺伝子によってコードさ

れるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

【0036】

本発明においては、被検者の好酸球細胞を試料とすることが好ましい。好酸球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、例えばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、白血球細胞を分離する。次に白血球細胞から、フィコールによる遠心分離等によって顆粒球細胞を分取し、更にCD16抗体を用いた好中球のディプリーション等によって好酸球細胞を分離することができる。分離された好酸球を破壊してライセートとすれば、前記タンパク質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートからmRNAを抽出すれば、前記遺伝子に対応するmRNAの測定のための試料とすることができる。好酸球のライセートやmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

【0037】

あるいは、好酸球の分離を行わず、全血や、末梢血白血球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。例えば好酸球に特異的に発現し、かつ細胞の状態にかかわらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

【0038】

また検出すべきタンパク質が分泌型のタンパク質である場合には、被検者の血液や血清などの体液試料に含まれる目的とするタンパク質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

【0039】

本発明によるアレルギー性疾患の検査の結果、特にアトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の患者において本発明の遺伝子の発現レベルが上昇している場合に、好酸球の減少を伴ってアレルギー症状の改善が進んでいるものと推定される。

【 0 0 4 0 】

また本発明は、下記の (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現レベルを低下させたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物に関する。

(a) TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b) TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【 0 0 4 1 】

本発明において、発現レベルの低下とは、遺伝子の機能を実質的に消失させたノックアウト状態が含まれる。本発明において、遺伝子の機能が実質的に消失した状態とは、遺伝子の発現や、この遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を見出すことができない状態を言う。遺伝子の発現レベルは、例えば実施例に示すような定量的なPCRにより確認することができる。また翻訳産物であるタンパク質の活性が実質的に見出せないことは、正常な状態と比較することにより確認することができる。

【 0 0 4 2 】

このようなトランスジェニック動物には、例えば遺伝子のコード領域に変異を導入し、人為的にアミノ酸配列の変異や終止コドンを生じさせて、本来のタンパク質の活性を発現できない状態とした動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、本発明の遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

【 0 0 4 3 】

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用

する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M. Lavitrano et al. Cell, 57, 717, 1989)。

【0044】

本発明のトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

【0045】

本発明のトランスジェニック動物には、例えば、ヒトTR3またはTINUR遺伝子（それぞれ配列番号：1または3に記載）の非ヒト動物種におけるホモログの発現が抑止されたノックアウト動物が含まれる。ノックアウト動物の表現型を観察することにより、ノックアウトした遺伝子の働きを具体的に知ることができる。配列番号：1または3に示す塩基配列からなる遺伝子は、ヒトにおいてアトピー皮膚炎患者の好酸球中で発現が上昇していた。従って、そのホモログをノックアウトした動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として有用である。

【0046】

例えば、本発明によるノックアウト動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

【0047】

ノックアウト動物の作製方法は公知である。例えばマウスにおいて、胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウト動物を作製する方法が公知である。例えば、受精卵に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラ動物を得る。このキメラ動物（キメラとは、2個以上の受精卵に基

づいた体細胞で形成される単一個体をいう)と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体を作製することができる。さらに、ヘテロ接合体同士を交配すれば、ホモ接合体が作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含む。

【0048】

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

【0049】

本発明によるトランスジェニック動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。

【0050】

本発明によって、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルがアトピー性皮膚炎患者の好酸球において、上昇することが明らかとなった。これは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、好酸球細胞においてTR3またはTINUR遺伝子、またはこれらの遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に低下させた動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。なお好酸球における発現レベルの低下とは、白血球集団全体における前記遺伝子の発現レベルの低下を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを低下させるの

は好酸球のみである場合のみならず、白血球集団全体において前記遺伝子の発現レベルが低下している場合を含む。本発明において機能的に同等な遺伝子とは、前記 (a) または (b) に記載した遺伝子のいずれかを意味する。本発明におけるモデル動物には、例えば前記トランスジェニック動物等を利用することができる。

【0051】

更に本発明は、候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法を提供する。本発明において、TR3またはTINUR遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において有意に発現レベルが上昇している。これは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、これらの遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、その発現レベルを上昇させることができる化合物を選択することによって、アレルギー性疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、タンパク質の活性発現のいずれかのステップを誘導する作用を持つ化合物である。本発明はさらに、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルに加えて、TR3またはTINUR遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を検出する方法を提供するとともに、TR3またはTINUR遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を上昇させる化合物を選択することによって、アレルギーの治療薬を得ることができる。

【0052】

候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響の検出方法は、in vivoで行うこともin vitroで行うこともできる。in vivoでの影響を検出するには、適当な被検動物を利用する。被検動物には、例えばアレルギー性疾患モデル動物や、前記 (a) または (b) に記載の遺伝子の好酸球細胞における発現が抑制されたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物を利用することができる。本発明に基づくin vivoでの発現レベルに与える影響の検出は、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

(1) 被検動物に候補化合物を投与する工程、

(2) 被検動物の好酸球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

【0053】

本発明の検出方法における被検動物としては、例えば、TR3またはTINUR遺伝子のアンチセンスを発現させることによりTR3またはTINUR遺伝子の発現を低下させたトランスジェニック動物を利用することができる。このようなトランスジェニック動物は、例えば以下のようにして作成することができる。すなわち、まずTR3またはTINUR遺伝子の配列の全長配列、あるいは部分配列を、適当なプロモーター配列の下流に逆向きの方向で組み込み、アンチセンスRNA発現ベクターを構築する。この発現ベクターを核へ導入すれば、TR3またはTINUR遺伝子のアンチセンスを発現し、TR3またはTINUR遺伝子の発現が低下したトランスジェニック動物を得ることができる。発現ベクターに使用するプロモーターとして、適当な薬剤等の物質により転写が調節されるプロモーターを用いれば、該物質の投与によってトランスジェニック動物におけるTR3またはTINUR遺伝子の発現レベルを調整することができる。

【0054】

このようにしてTR3またはTINUR遺伝子の発現を低下させたモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物の好酸球におけるTR3またはTINUR遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。

【0055】

本発明のスクリーニング方法により、TR3またはTINUR遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、例えば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

- ・ TR3またはTINUR遺伝子の発現をもたらすシグナル伝達経路の活性化
- ・ TR3またはTINUR遺伝子の転写活性の上昇
- ・ TR3またはTINUR遺伝子の転写産物の安定化もしくは分解の阻害、等

【0056】

また、in vitroにおいては、例えば、前記 (a) または (b) に記載した遺伝

子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、前記遺伝子の発現レベルを検出する方法を利用することができる。具体的には、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

(1) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(2) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

【0057】

本発明において、工程 (1) に用いるための細胞は、これらポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

【0058】

ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法 (HVJ (センダイウイルス)、ポリエチレングリコール (PEG)、電気的細胞融合法、微少核融合法 (染色体移入)) が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン (gene gun) を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

【0059】

本発明の検出方法においては、前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞として、株化白血球細胞を用いることもできる。株化白血球細胞としては、Eo1、YY-1、HL-60、TF-1、および AML14.3D10 など白血球由来の株化細胞を例示できる。白血球細胞株の中でも、好酸球に由来する細胞株は、

本発明の検出方法に好適である。好酸球に由来する細胞株としては、例えば、Eo1、YY-1、AML14.3D10等を挙げることができる。

【0060】

Eol(Eol-1: Saito H et al, Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. Blood 66, 1233-1240, 1985)は、林原研究所より入手することができる。同様にYY-1(Ogata N et al, The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor. Int.Arch. Allergy Immunol., Suppl 1, 24-27, 1997)は、サイトシグナル研究所より分与される。またAML14.3D10(Baumann MA et al, The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. Stem Cells, 16, 16-24, 1998)は、米国オハイオ州、Research Service, VA Medical Center DaytonのPaul CCより、商業的に入手可能である。

【0061】

その他、未分化白血球細胞株であるHL-60クローン15(ATCC CRL-1964)は、酪酸存在下で1週間程度培養すれば、好酸球に分化し好酸球細胞株とすることができる。好酸球であることは、形態的に、多形核で好酸球顆粒が認められることにより判別することができる。形態的な観察は、ギムザ染色やディフクイック染色によって行われる。一般に、好酸球を含むヒト白血球細胞株は、白血病の患者サンプルから不死化した細胞をクローニングすることにより樹立することができる。従って、当業者は、必要に応じて好酸球細胞株を公知の方法によって得ることができる。このスクリーニング方法においては、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞における前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する。

【0062】

in vitroにおける検出方法のための細胞として、前記(a)または(b)に記載したポリヌクレオチドの発現を調節した形質転換細胞を用いることができる。このような形質転換細胞としては、例えば当該ポリヌクレオチドのアンチセンス

発現ベクターを形質転換した細胞を挙げるができる。アンチセンス発現ベクターによる形質転換細胞は、前記トランスジェニック動物の作成と同様の原理によって得ることができる。得られた形質転換細胞を用いて該遺伝子の発現レベルに与える候補化合物の影響を検出することもできる。

【0063】

なお本発明の方法において、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルは、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルのみならず、対応するmRNAを検出することにより比較することもできる。mRNAによって発現レベルの比較を行うには、タンパク質試料の調製工程に代えて、先に述べたようなmRNA試料の調製工程を実施する。mRNAやタンパク質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

【0064】

さらにTR3またはTINUR遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

【0065】

転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、TATAボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子として、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

【0066】

TR3またはTINUR遺伝子の転写調節領域は、当業者においては、一般的な方法、例えば、以下の方法により取得することができる。まず、配列番号：1または3に記載された塩基配列に基づいて、BACライブラリー、YACライブラリー等のヒトゲノムDNAライブラリーから、PCRまたはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該cDNAの配列を含むゲノムDNAクローンを得る。得られたゲノムDNAの配列を基に、TR3またはTINUR遺伝子の転写調節領域を推定し

、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子の上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

【0067】

本発明の前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、前記ポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

【0068】

すなわち本発明は、in vivoおよび／またはin vitroにおいて、候補化合物による前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0069】

あるいは本発明は、TR3またはTINUR遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対象と比較してレポーター遺伝子の発現を上昇させる化合物を選択することにより、TR3またはTINUR遺伝子の発現を誘導する化合物を取得することができる。あるいは、リガンド結合領域に結合するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法に関する。

【0070】

本発明らによってアレルギー性疾患に関連するタンパク質として見出されたTR3またはTINUR受容体タンパク質は、オーファン受容体であり生体内リガンド活性

物質はこれまでのところ見つかっていない。TR3またはTINURタンパク質のリガンド活性物質は、好酸球細胞内でダイレクトにそれぞれTR3またはTINURを活性化し、アポトーシスを促進させるものと考えられる。従って、TR3またはTINUR受容体のリガンド活性物質はアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。通常、受容体タンパク質と結合し得る化合物の探索を行うことにより、該受容体のリガンドを取得することが可能である。

【0071】

本発明は、TR3またはTINURタンパク質と結合し得る化合物を選択することを特徴とする、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。本方法においては、TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物を接触させ、次いで、それぞれの受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定し、それぞれの受容体タンパク質と結合する化合物を選択する。また、単に結合をするのみでなく、TR3またはTINURの転写活性を測定し、アゴニスト、アンタゴニストを選択する。

【0072】

本方法におけるTR3またはTINUR受容体タンパク質には、それぞれその部分ペプチドも含まれる。上記方法におけるTR3またはTINUR受容体タンパク質と被検化合物との結合活性の測定は、当業者においては公知の方法を利用して実施することができる。

例えば、TR3またはTINURと結合する化合物がタンパク質である場合には、本発明のスクリーニング方法は、ウエストウエスタンブロッティング法により行うことができる。具体的には、TR3またはTINURタンパク質と結合するタンパク質（被検タンパク質）を発現していることが予想される組織または細胞よりファージベクター（ λ gt11, ZAPIIなど）を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定する。次いで、TR3またはTINURタンパク質をビオチンラベル化、あるいはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、被検タンパク質を発現しているプラークを、ストレプトアビジンや抗GST抗体などにより検出を行うことにより、結合活性を評価することができる。

【0 0 7 3】

また、本発明のアレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法の別の態様においては、下記の工程を含む。

- (1) TR3もしくはTINUR受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得るDNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合するDNA配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有するDNA、を導入した細胞を提供する工程
- (2) 前記細胞と被検化合物を接触させる工程
- (3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

【0 0 7 4】

上記方法における「機能的に結合した」とは、TR3もしくはTINUR受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域が、該受容体タンパク質のリガンドもしくはリガンド様化合物と結合した際に、レポーター遺伝子が発現し得るよう結合した状態を指す。上記方法における「転写調節領域結合タンパク質」としては、通常、GAL4タンパク質を好適に使用することができる。また、上記「転写調節領域結合タンパク質の結合し得るDNA配列」としては、例えば、GAL4結合DNA領域を挙げることができる。さらに本発明の上記スクリーニング方法は、ハイスループットで行うことが可能である。

【0 0 7 5】

また、本発明のスクリーニング方法の好ましい態様としては、「twoハイブリッドシステム」（例えば、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」（いずれもclontech社製）、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（stratagene社製）、文献「Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」）を用いてスクリーニングを行うことができる。本発明の上記方法は、より具体的には、以下のようにして実施することができるが、この方法に特に限定されず、当業者においては、以下に例示した方法を適宜改変して

実施することが可能である。

【0076】

two-ハイブリッドシステムにおいては、TR3またはTINURタンパク質、あるいはその部分ペプチドを、通常、GAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、TR3またはTINURタンパク質、あるいはその部分ペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する（酵母細胞内でTR3またはTINURタンパク質、あるいはそのリガンド結合領域を含む部分ペプチドと結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするタンパク質を得ることができる。これによりTR3またはTINURタンパク質、あるいはその部分ペプチドに結合するタンパク質もしくはその遺伝子を調製することが可能である。twoハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。twoハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞等を使って行うこともできる。

【0077】

本発明者らは、哺乳動物細胞を用いたtwoハイブリッドシステムを応用して、TR3またはTINURタンパク質の転写活性化機能を上昇させるリガンドをスクリーニングすることが可能なハイスループット系を構築した。この系は、従来の哺乳動物におけるtwoハイブリッドシステムを改良したものであり、この系の概略を図2に示す（詳細は後述の実施例を参照）。

本発明のスクリーニング方法は、好ましくは、上記の本発明者らによって開発されたハイスループット系を用いて行うことができる。

【0078】

TR3またはTINURは、アトピー性皮膚炎末梢血のような白血球が機能亢進した状

態で発現誘導され、その結果として細胞にアポトーシスが誘導される可能性が高い。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで本発明者らは、このような条件で産生されると予想される低分子の脂溶性メディエーターをリガンド候補被検化合物として、上記の方法によりスクリーニングを行った。そして本発明者らは、脂溶性メディエーターの中から、リガンド活性物質として、TR3については、prostaglandin A₂, prostaglandin A₁, 15-epi prostaglandin A₁, 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin A₂, 15(R)-15-methyl prostaglandin A₂, delta12- prostaglandin J₂等を、またTINURについてはprostaglandin A₂, prostaglandin A₁, 15-epi prostaglandin A₁, 17-phenyl trinor prostaglandin A₂, delta12- prostaglandin J₂, 15(R)-15-methyl prostaglandin A₂, 16-phenoxy tetranor prostaglandin A₂等を取得することに成功した。これらの化合物は、シクロペントノン構造を有するプロスタグランジンである。このことは、本発明の方法によってTR3またはTINURの転写活性化機能をアップレギュレートするリガンド活性物質を実際に取得することが可能であることを示すものである。

【0079】

TR3またはTINURタンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、TR3またはTINURタンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここにTR3またはTINURタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、TR3またはTINURタンパク質と結合したタンパク質を調製することができる。

【0080】

取得したタンパク質は、例えば、該タンパク質のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードするDNAを得ることができる。

【0081】

本発明において、結合した化合物を検出または測定する手段として表面プラス

モン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、TR3またはTINURタンパク質と被検化合物との間の相互作用を、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。従って、BIAcore等のバイオセンサーを用いることによりTR3またはTINURタンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

【0082】

TR3またはTINURタンパク質と結合する化合物を単離することは、当業者においては通常行い得ることである。上記以外の方法として、例えば、固定したTR3またはTINURタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法等を示すことができる。

【0083】

本発明による、候補化合物のTR3またはTINUR遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出する方法に用いられる細胞、並びに該遺伝子の発現レベルを調べるためのポリヌクレオチド、あるいは抗体を組み合わせ、この方法のための検出用キットとすることができる。キットには、陽性対照や陰性対照として用いられる候補化合物や指示書を組み合わせることもできる。本発明に基づく候補化合物のTR3またはTINUR遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出するためのキットは、例えば、TR3またはTINUR遺伝子の発現レベルや転写活性化機構を修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。

【0084】

本発明のスクリーニング方法に用いる被検候補化合物としては、特に制限されないが、例えば、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー等が挙げられる。また、本発明のTR3またはTINURタンパク質と結合する化合物のスクリーニン

グ方法においては、特に制限されないが、低分子の脂溶性メディエーターを被検候補化合物とすることが好ましい。

【0085】

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。TR3またはTINUR遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加する。このような好酸球増多の病態においてこれらのアポトーシス関連遺伝子が誘導されるのは、末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、これらの遺伝子の発現あるいは機能を増強することができる化合物には、アトピー性皮膚炎の症状を抑える作用が期待できる。

【0086】

また、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、TR3またはTINUR活性化とそれに伴う好酸球アポトーシス誘導という全く新しい作用機序を有するアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。従って本発明は、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を提供する。

【0087】

なお上記化合物には、本発明のスクリーニング方法を用いて単離しうる化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される化合物も含まれる。上述のように、脂溶性メディエーターの中から、TR3またはTINURの転写活性化を増強する化合物（TR3またはTINURのリガンド活性物質）として本発明者らにより、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが見出された。従って、本発明のアレルギー性疾患治療薬として、例えば、本発明のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を好適に挙げることができる。該プロスタグランジンの具体例としては、TR3についてはprostaglandin A₂, prostaglandin A₁, 15-epi prostaglandin A₁, 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin A₂, 15(R)-15-methyl prostaglandin A₂, delta12- prostaglandin J₂等を、またTINURについてはprostaglandin A₂, prostaglandin A₁, 15-epi prosta

glandin A₁, 17-phenyl trinor prostaglandin A₂, delta¹²- prostaglandin J₂, 15(R)-15-methyl prostaglandin A₂, 16-phenoxy tetranor prostaglandin A₂等を挙げることができる。

【0088】

また、TR3またはTINURの合成リガンドは、当業者においてはそれぞれTR3またはTINURの立体構造とのドッキングスタディーから容易に推察され合成展開することが可能である。

【0089】

「ドッキングスタディー」とは通常、受容体の立体構造に基づいた3Dクエリーファーマコファーモデルにより、数10万個の化合物の3次元DBの中から、リガンド結合ドメインにフィットする化合物やコンフォーメーションをコンピュータ上で探索することを言う。ドッキングスタディーは、例えば、以下の(1)～(4)の手順に従って行われる。

- (1) Modelerによるタンパクの3D構造の構築 (ホモロジーモデル)
- (2) C2. LigandFitによる結合部位の検索
- (3) C2・SBFによる結合部位のPharmacophore クエリ構築
- (4) Pharmacophoreクエリによる3Dデータベースの検索

3D Pharmacophore検索に関する文献としては、例えば、Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design (Iul Biotechnology Series, 2)-US-ISBN:0963681761 (Hardcover) Guner, Osman F. (Edt) /Publisher:Intl Univ Line Published 1999/12等を挙げることができる。

【0090】

このような合成リガンドを有効成分として含有する薬剤もまた、本発明のアレルギー性疾患治療薬に含まれる。また、上記合成リガンドは被検候補化合物として、本発明の上記方法に供することにより、真のリガンドであるか否かを評価することも可能である。

【0091】

本発明のアレルギー性疾患治療薬は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することも可能である。本発明のア

アレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

【0092】

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。非経口剤としては、例えば、注射剤、座薬、塗り薬等を挙げることができる。注射剤としては、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

【0093】

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき0.1 mgから500 mgの範囲で、好ましくは0.5 mgから20 mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

【0094】

また本発明者らは、TR3またはTINUR受容体タンパク質の発現が亢進することにより、細胞がアポトーシス誘導することを見出した。従って、細胞においてTR3またはTINURタンパク質を活性化させることにより、アポトーシスを誘導させることが可能である。従って本発明は、細胞におけるTR3またはTINUR受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法を提供する。上記方法には、TR3またはTINUR遺伝子の発現を活性化させることにより、細胞のアポトーシス誘導を行う方法も含まれる。

【0095】

本方法の好ましい態様においては、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテン構造を有するプロスタグランジンと細胞とを接触させることにより、アポトーシスの誘導を行う。本発明の上記方法における細胞は、好酸球細胞であることが好ましい。アトピー性皮膚炎患者の末梢血好酸球数が減少することが知られている。よって、本発明の方法を利用して好酸球を特異的に細胞死に導くことにより、アレルギー性疾患を治療することが

可能と考えられる。即ち、本方法は、新たなアレルギー性疾患の治療方法の開発へ繋がるものと大いに期待される。

【0096】

また、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンは、アポトーシスを誘導する作用があるものと考えられることから、本発明は、これら化合物を含有するアポトーシス誘導剤も提供する。

【0097】

【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 アトピー性皮膚炎患者末梢血好酸球における、アフィメトリックス社ジーンチップによるディファレンシャル発現解析

発現変動している新しい治療関連遺伝子あるいは診断に有用な遺伝子を見出すことを目的として、アトピー性皮膚炎患者の種々の病態（軽症、重症ステロイド感受性、重症ステロイド抵抗性）と健常人の末梢血好酸球で発現している遺伝子について、以下のようにして、ジーンチップを用いたディファレンシャルな発現比較解析を行った。

【0098】

血液を採取した6例のアトピー性皮膚炎患者および2例の健常人のプロファイルを表2に示す。アレルゲン非特異的（Total IgE）、ダニおよびスギ特異的IgEはEIA法により測定した。すなわち、抗ヒトIgE抗体を結合させたキャップに被検血清を反応させ、血清中のアレルゲン非特異的IgE抗体、またはダニ、スギ特異的IgE抗体を結合させた。次に、 β -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体と基質液（4-メチルウンベルフェリル- β -D-ガラクトピラノシド）を加え、反応させて蛍光物質を生成させた。反応停止液を加えて反応を停止させ、同時測定の標準IgEの蛍光強度より抗体濃度を決定した。LDHの測定は、UV法（Wroblewski-La Due法）により、ピルビン酸とNADHの反応によるNADHの減少速度を吸光度の減少から算出した。LDH値の測定には、LタイプワコーLDH（和光純薬）と7170型自動分析装

置（日立）を用いた。好酸球数は、EDTA添加血液 2mlを試料として鏡検法と自動血球分析装置SE-9000（RF/DCインピーダンス方式、Sysmex製造）により測定した

。

【 0 0 9 9 】

【表 2】

	健常		AD 軽症 *		AD 重症 (ステロイド感受性 **)		AD 重症 (ステロイド抵抗性**)	
	男	女	男	女	女	男	男	男
性別								
年齢	23	17	30	25	12	16	24	16
全 IgE (U/ml)	45	25	5	380	2,400	15,000	14,000	70,000
cedar IgE	<0.34	<0.34	<0.34	6.12	<0.34	94.8	60.6	>100
mite IgE	<0.34	<0.34	<0.34	18.2	>100	>100	>100	>100
LDH	228	241	211	296	477	465	303	595

表中、*は全体の表面積における皮膚炎の領域 $\leq 10\%$ 、**は標準的な局所グ

ルコルチコイド治療と比較した際の感受性を表す。

【0100】

(1) 末梢血好酸球からのDNAチップ用のRNA採取

患者から採取した全血に3%デキストラン溶液を加えて30分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液 (Ficoll-Paque PLUS; アマシャムファルマシアバイオテク) の上に載せて1500rpm、30分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分をCD16抗体磁気ビーズと4℃で30分反応させ、MACSを用いた分離でトラップさせずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。

【0101】

上記のように調製した好酸球をIsogen (日本ジーン; 和光純薬) に溶解し、この溶液から、Isogenに添付されているプロトコルに従ってRNAを分離した。クロロホルムを加え、攪拌遠心して水層を回収した。次にイソプロパノールを加え、攪拌遠心して沈殿の全RNAを回収した。回収した全RNAは、DNase (日本ジーン; 和光純薬) を加えて37℃15分反応させ、フェノール-クロロホルム抽出してエタノール沈殿でRNAを回収した。これらのRNAを用いた以降のジーンチップによる解析については、アフィメトリックス社のプロトコルに従った。

【0102】

(2) DNAチップ用のcDNA合成

全RNA 2-5 μ gから、T7-(dT)₂₄ (Amersham Pharmacia Biotech) をプライマーとして、Affymetrix社のExpression Analysis Technical Manualの方法に従いSuperscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies社) を用いて逆転写し1本鎖 cDNAを作製した。T7-(dT)₂₄ プライマーは、以下のようにT7プロモーターの塩基配列にd(T)₂₄を付加した塩基配列からなる。

T7-(dT)₂₄ プライマー: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3' (配列番号: 11)

【0103】

次に、Expression Analysis Technical Manualに従い、DNA Ligase, DNA polymerase I、およびRNase Hを加え、2本鎖cDNAを合成した。cDNAをフェノール・ク

ロロホルム抽出後、Phase Lock Gelsに通し、エタノール沈澱し精製した。

さらに、BioArray High Yield RNA Transcription Labeling Kitを用い、ビオチンラベルしたcRNAを合成した。RNeasy Spin column (QIAGEN)を用いてcRNAを精製し、熱処理により断片化した。

そのうち1~5 μ gのcRNAをExpression Analysis Technical Manualに従いHybridization Cocktailに加えた。これをアレイに入れ、45℃で16時間ハイブリダイゼーションした。DNAチップとしてはGeneChip^R HG-U95A (Affymetrix社製)を用いた。GeneChip^R HG-U95Aは、およそ12,000種類のヒトcDNAやESTに由来する塩基配列からなるプローブで構成されている。

DNAチップを洗浄した後、Streptavidin Phycoerythrinを加え染色した。洗浄後、normal ヤギIgGとビオチン化ヤギ抗ストレプトアビジンIgG抗体の抗体混合液をアレイに加えた。さらに、蛍光強度を増強する目的で、再度Streptavidin Phycoerythrinを加え染色した。洗浄後、スキャナーにセットし、DNAチップ解析ソフトにて解析した。

【 0 1 0 4 】

(3) DNAチップ解析

DNAチップ解析ソフトであるSuiteを用いて発現蛍光感度を測定し、データ解析を行った。まず全てのチップについてAbsolute analysisを行い、用いたサンプル各々の遺伝子発現量を測定した。

1個のチップデータの解析は、プローブセットのパーフェクトマッチとミスマッチの蛍光強度を比較して、positiveとnegativeを決定した。Positive Fraction、Log Avg、Pos/Negの値から判定されるAbsolute CallであるP(present)、A (absent)、およびM (marginal)の3区分の判定を行った。用語定義は以下に示した。

【 0 1 0 5 】

Positive Fraction; Positiveなペアの割合

Log Avg; パーフェクトマッチとミスマッチのプローブセルの蛍光強度比の対数の平均

Pos/Neg; Positiveペア数とNegativeペア数の比

【0106】

また、パーフェクトマッチとミスマッチのプローブセルの蛍光強度の差の平均値であるAverage Difference (Avg Diff) も計算した。

患者と健常人で3倍以上発現変動のあった遺伝子を選別したが、HG-U95Aチップ遺伝子約12,000個の中からTR3が選ばれてきた。健常を含めて各群2例の好酸球RNAをジーンチップにかけるので、各症例間2x2で4通りの発現比較ができる。TR3は、健常と重症（ステロイド感受性）間の4つすべての組合せにおける発現比較で、いずれも3倍以上の変動（重症で亢進）という結果が得られた（表3）。

【0107】

【表3】

Experiment Name	Probe Set	Accession No.	Annotation	Avg Diff	Abs Diff	Diff Call	Avg Diff Change	Fold Change B=A	
C4E307-315	280_g.at	L13740	TR3 orphan receptor	1316	P	I	1208 *	~3.7	4(4I)
C4E307-340	280_g.at			1234	P	I	1259 *	~3.9	
C4E309-315	280_g.at			2042	P	I	1758 *	~4.9	
C4E309-340	280_g.at			1913	P	I	1956 *	~5.5	

【0108】

ABI7700に用いたプライマーおよびTaqManプローブは、スイートより得られるaccession NoをもとにNCBIの配列情報からPrimer Express (PEバイオシステムズ) により設計した。TaqManプローブの5'末端はFAM(6-carboxy-fluorescein)で、また3'末端はTAMRA(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)で標識されている。TaqMan法に使用したプライマーおよびプローブは次の通りである。

【0109】

Primer1(5') : CCACTTTGGGAAGGAAGATGCT (配列番号: 5)

Primer2(3') : ACTTTCGGATGACCTCCAGAGA (配列番号: 6)

TaqMan probe : ATGTACAGCAGTTCTACGACCTGCTCTCCG (配列番号: 7)

【0110】

鋳型には全RNAからポリT(12~18mer)をプライマーとして逆転写したcDNAを用いた。コピー数を算出する標準曲線のために両プライマーで増幅される塩基配列領域を含むプラスミドクローンを各々の遺伝子について準備し、その段階希釈を鋳型として反応を行った。PCR増幅のモニタリングのための反応液の組成は表4

に示した。

【 0 1 1 1 】

【表 4】

ABI-PRISM 7700の反応組成（1 ウェルあたりの反応量）

滅菌蒸留水	25.66 (μ L)
10x TaqMan バッファーA	5
25mM MgCl ₂	7
dATP(10mM)	1.2
dCTP(10mM)	1.2
dGTP(10mM)	1.2
dUTP(10mM)	1.2
Forward Primer (100 μ M)	0.15
Reverse Primer (100 μ M)	0.15
TaqMan プローブ(6.7 μ M)	1.49
AmpliTaq Gold (5U/ μ L)	0.25
AmpErase UNG (1U/ μ L)	0.5
テンプレート溶液	5
総量	50

【 0 1 1 2 】

また、試料中のcDNA濃度の差を補正するため、補正用内部標準として β -アクチン(β -actin)遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子のコピー数を算出した。 β -アクチン(β -actin)遺伝子の定量には、ヒトcDNAを鋳型として用いた。

【 0 1 1 3 】

β アクチン測定用のプライマーとプローブは、TaqMan β -actin Control Reagents (PEバイオシステムズ) に添付のものを用いて行った。塩基配列は以下の通

りである。 β アクチンにより補正した。

・ β アクチンフォワードプライマー

TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A (配列番号：1 2)

・ β アクチンリバースプライマー

CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G (配列番号：1 3)

・ β アクチンTaqManプローブ

5'-(FAM)ATGCCC-T(TAMRA)-CCCCCATGCCATCCTGCGTp-3' (配列番号：1 4)

FAM:6-carboxy-fluorescein

TAMRA:6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine

【0 1 1 4】

ジーンチップでの発現解析は遺伝子スクリーニングを主眼とし、各群 2 例しかないので、例数が一群 1 0 例以上まとまった大きな患者末梢血好酸球パネル (表 5) において、ABI7700で健常人と患者の発現比較を行い、スクリーニングの信頼性をチェックした。

【0 1 1 5】

【表 5】

	No.	サンプル ID	ドナーID	トランスファー ID	性別	年齢	Total IgE	抗ダニ IgE	抗スギ IgE	LDH	好酸球(%)	好酸球 (mm3)
健康人	1	BL10138	V-00026	10138	F	26	5	<0.34	<0.34	105	0	80
	2	BL10140	V-00015	10140	M	52	81	0.71	<0.34	78	2	150
	3	BL10141	V-00040	10141	F	32	59	0.37	<0.34	326	0	40
	4	BL10142	V-00032	10142	F	35	83	14.6	11.2	187	3	250
	5	BL10143	V-00029	10143	F	45	29	<0.34	1.75	113	2	90
	6	BL10144	V-00027	10144	F	29	17	<0.34	1.51	74	2	90
	7	BL10145	V-00034	10145	F	26	120	<0.34	17.1	272	3	590
	8	BL10146	V-00030	10146	F	30	560	<0.34	63.2	251	1	120
	9	BL10147	V-00001	10147	M	50	44	<0.34	17.9	265	4	130
	10	BL10148	V-00003	10148	M	43	220	4	3.54	242	5	250
	11	BL10149	V-00028	10149	M	32	110	1	9.84	245	3	180
	12	BL10150	V-00035	10150	M	63	86	<0.34	12.6	209	5	300
	13	BL10151	V-00019	10151	M	48	42	<0.34	14	300	1	180
軽症	14	BL00058	PA00079	9707311	M	0	581				9.7	1390
	15	BL00068	PA00084	9708072	F	13	1687				6.8	365
	16	BL00112	PA00112	9712051	M	2	519				2.2	151
	17	BL00123	PA00120	9712252	F	10	799				12.9	1050
	18	BL00133	PA00129	9712266	M	12	274				1.6	122
	19	BL00198	PA00023	9807213	M	21	9630				15.1	1080
	20	BL00207	PA00181	9807273	F	6	668				8	635
	21	BL00217	PA00190	9808033	M	5	777				22.3	1790
	22	BL00221	PA00042	9808061	F	8	1494				6.6	378
	23	BL00234	PA00029	9808311	F	5	702				6.6	510
	24	BL00252	PA00176	9901071	M	14	2096				7.2	333
	25	BL00259	PA00162	9902161	M	20	2622				13.3	846
	26	BL00270	PA00213	9903292	M	15	230				7.5	368
	27	BL00317	PA00240	0003282	F	14	106	3.77	24.7		2.8	154
	28	BL00327	PA00136	0004033	M	8	1178	<0.35	<0.35		4.4	396
中等症	29	BL00095	PA00099	9710031	M	3	159				2.5	190
	30	BL00128	PA00124	9712261	M	12	7158				5.2	361
	31	BL00145	PA00048	9802192	F	9	2349				5.1	193
	32	BL00268	PA00179	9903261	M	9	512				9.5	906
	33	BL00278	PA00217	9904061	M	15	1082				22.1	1110
	34	BL00328	PA00175	0004041	M	7	4775	>100	93.3		7.1	638
	35	BL00089	PA00098	9709092	M	7	359				13.3	638
	36	BL00110	PA00110	9711281	F	3	11.5				6.1	198
	37	BL00122	PA00119	9712251	F	12	528				9.7	643
	38	BL00139	PA00025	9801082	M	18	22614				13.7	1140
	39	BL00156	PA00143	9803264	M	6	2625				5	551
	40	BL00287	PA00221	9906231	M	15	1149				3.7	601
	41	BL00296	PA00059	9908201	M	5	1639				6.8	477
	42	BL00323	PA00244	0003302	M	6	4532	>100	69.1		11	909
	43	BL00335	PA00259	BL18526369	F	14	1581	>100	5.46		15.9	1820
重症	44	BL00078	PA00090	9708251	F	3	135				3.8	254
	45	BL00084	PA00067	9709021	M	3	2149				9.8	1000
	46	BL00163	PA00148	9803304	M	11	137				3.5	274
	47	BL00168	PA00152	9804033	F	19	2732				5.2	261
	48	BL00180	PA00163	9805151	M	17	14758				13.6	1010
	49	BL00242	PA00001	9810061	M	19	13747				13	1230
	50	BL00243	PA00200	9810221	F	6	10967				5.9	662
	51	BL00247	PA00071	9812211	M	16	11610				13.4	972
	52	BL00260	PA00209	9902162	M	0	136				2.5	277
	53	BL00262	PA00120	9902181	F	10	120				3	109
	54	BL00150	PA00137	9803161	F	8	371				4.9	375
	55	BL00257	PA00208	9902053	M	11	268				7.6	468
	56	BL00293	PA00227	9907221	F	10	18301				13.8	1750
	57	BL00298	PA00229	9909141	M	11	9591	>100	18.2		11.9	940
	58	BL00314	PA00238	0002151	M	19	23726	>100	30		6	376
	59	BL00318	PA00241	0003283	F	7	131	<0.35	<0.35		5.7	330
	60	BL00321	PA00243	0003286	F	4	232	<0.35	<0.35		9.1	856
	61	BL00337	PA00261	0005191	F	29	474	52.5	31.6		12.3	797

【0116】

末梢血好酸球におけるTR3の発現は、健常に比してアトピー性皮膚炎患者で、症例の強弱にはあまりかわりなく多重比較で有意に亢進することが確認された（表 6、図 1）。

【 0 1 1 7 】

【表 6】

CIE-2 L13740	Blood	beta- actin(raw) copy/ ng	L13740(raw)		beta補正用 raw(/ng)/平均	L13740補 正 raw/beta 補正
			copy/ 5ng	copy/ 1ng		
健常人13	1	253126	1119	224	1.01130301	221
	2	541166	5637	1127	2.16209434	521
	3	214239	2454	491	0.855938946	573
	4	369621	5176	1035	1.476729393	701
	5	716536	6324	1265	2.862741935	442
	6	169173	6969	1394	0.675887508	2062
	7	601310	11426	2285	2.40238633	951
	8	213062	2097	419	0.851236036	493
	9	371589	1266	253	1.484591854	171
	10	646297	1955	391	2.582119848	151
	11	208737	2183	437	0.833956352	524
	12	212114	13130	2626	0.84744903	3099
	13	379539	1205	241	1.516355526	159
軽症15	14	508758	4893	979	2.032618527	481
	15	248937	6962	1392	0.994564691	1400
	16	221813	12928	2586	0.886198604	2918
	17	315168	11862	2372	1.259174796	1884
	18	141827	11906	2381	0.566636769	4202
	19	244028	17542	3508	0.974953584	3598
	20	348051	14940	2988	1.390552351	2149
	21	387693	20063	4013	1.548931234	2591
	22	268468	4232	846	1.072599907	789
	23	206673	5843	1169	0.825709955	1415
	24	136652	10968	2194	0.545959033	4018
	25	218963	4619	924	0.874812329	1056
	26	209273	3879	776	0.836097009	928
	27	131977	3296	659	0.52728236	1250
	28	121064	22191	4438	0.483680797	9176
中症 寛解期6	29	165901		0	0.662815331	0
	30	134119	12595	2519	0.535841346	4701
	31	86340	4693	939	0.344949082	2721
	32	472440	3797	759	1.887519071	402
	33	170914	24513	4903	0.682845244	7180
	34	367818	1497	299	1.469525949	204
中症 増悪期9	35	162258	23698	4740	0.648261218	7311
	36	90969		0	0.363443211	0
	37	246460	24652	4930	0.984671042	5007
	38	146805	12808	2562	0.586522301	4367
	39	179179	10603	2121	0.715863818	2962
	40	138858	4884	977	0.554771366	1761
	41	133317	5210	1042	0.532635051	1956
	42	171308	52561	10512	0.684419966	15359
	43	285295	904	181	1.139827753	159
重症 寛解期10	44	154902	4994	999	0.618872876	1614
	45	78948	12992	2598	0.315418709	8238
	46	231612	4595	919	0.925346905	993
	47	155564	7337	1467	0.621516584	2361
	48	385848	1428	286	1.541561787	185
	49	264744	437	87	1.05772078	83
	50	144715	35283	7057	0.578174465	12205
	51	205943	7545	1509	0.822795017	1834
	52	155395	5335	1067	0.62084169	1719
	53	151703	21933	4387	0.606092505	7238
重症 増悪期8	54	397821	2000	400	1.589395971	252
	55	446400	5057	1011	1.783480045	567
	56	280724	895	179	1.121564845	160
	57	161385	6500	1300	0.644775207	2016
	58	134978	11103	2221	0.539271624	4118
	59	24740	19712	3942	0.0988414	39885
	60	241793	37484	7497	0.966023991	7760
	61	93068	21520	4304	0.371831799	11575
total		15268113				

【0118】

(4) 統計解析

上記のデータを利用して、パラメトリック多重比較検定、およびノンパラメトリック多重比較検定を行った。統計解析は、The SAS SYSTEMのSAS前臨床パッケージVer 4.0 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。結果を表7に示す。健常と軽症、健常と中等症、健常と重症の間の多重比較において、いずれも有意に患者群で高かった。

【0119】

【表7】

		C4E HG-U95A 統計解析結果(β actin補正)					
遺伝子名		パラメトリック多重比較			ノンパラメトリック多重比較		
		Dunnett	p値	Tukey	p値	Dunnett	p値
L13740	TR3 orphan receptor	AS > Nm	0.0533		AL > Nm	0.0339	AM > Nm 0.0189
					AM > Nm	0.01	AS > Nm 0.0378
					AS > Nm	0.0204	

(Nm=健常人、AL=アトピー性皮膚炎軽症、AM=アトピー性皮膚炎中等症、AS=アトピー性皮膚炎重症)

【0120】

アトピー性皮膚炎病態の末梢血好酸球で、このようなアポトーティックな性格の遺伝子が亢進しているのは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブなフィードバック制御が働くためと考えられる。

【0121】

【実施例2】 TR3受容体リガンドの探索

好酸球を特異的に細胞死に導く経路を、TR3の機能の増強を通じて促進することは、喘息のみでなく、本発明者らが調べたアトピー性皮膚炎も含めた種々のアレルギー疾患の治療に繋がる可能性が高い。TR3は構造上核内受容体であるが、オーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はまだわかっていない。もしもそれらが見出されれば、好酸球細胞内でダイレクトにTR3を活性化しアポトーシスを促進させることができる。従って、リガンド活性物質は抗アレルギー薬としての可能性が高いと考え、リガンドスクリーニングのためのハイスループット系を構築した。

【0122】

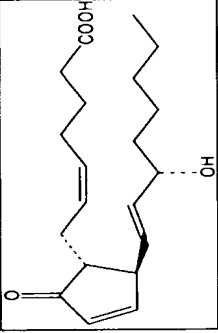
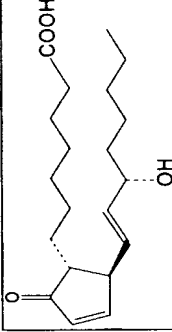
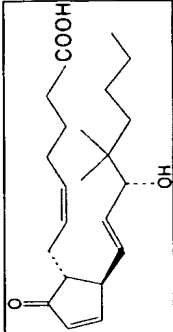
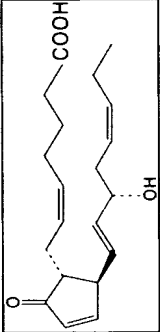
Mammalian Two Hybrid のシステムを若干改変し、図2のように、pBIND の中にTR3のリガンド結合領域配列または全長遺伝子(図3)を挿入し、TR3とGAL4のDNA結合領域がin frameで融合したタンパク質が発現されるようにした。TR3のリガンド結合領域配列をpBINDに挿入したプラスミドとGAL4結合サイトをもったルシフェラーゼレポータープラスミドをNIH3T3細胞にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を自動測定するが、このときさらに、TR3と会合してヘテロダイマーを形成する転写因子であるretinoic acid X receptor (RXR) α 遺伝子を一緒に加えて活性を測定することも試みた。この系にさらに低分子物質を加えて、転写増強活性でスクリーニングを行うことができる。

【0123】

TR3は、アトピー性皮膚炎末梢血のように、活性化した好酸球で発現が増強する。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで、このような条件で産生されと考えられる低分子の脂溶性メディエーターをアッセイ系に加え、ルシフェラーゼ活性の増強作用で評価した。脂溶性メディエーターの中から、prostaglandin A₂, prostaglandin A₁, 15-epi prostaglandin A₁, 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin A₂, 15(R)-15-methyl prostaglandin A₂, delta12- prostaglandin J₂等のシクロペンテノン構造をもったプロスタグランジンに、TR3の転写活性化能を増強させる作用があることを見出した(図4、表8~12)。このように本発明者らの確立した方法によって、ハイスループットでTR3の生体内リガンド及び合成リガンドを発見する道が開かれたとともに、prostaglandin A₂, prostaglandin A₁等の化合物およびその近辺の代謝物が、TR3の真の生体内リガンドとしての可能性が高いことが明らかになった。

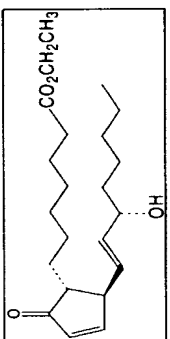
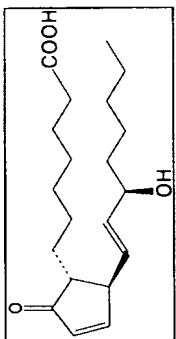
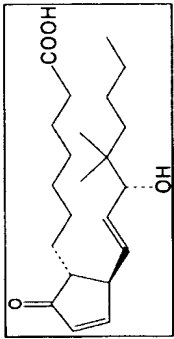
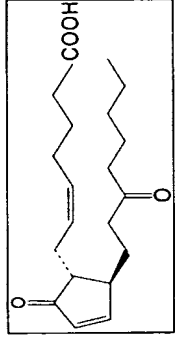
【0124】

【表 8】

化合物名	構造式	リガンド濃度 細胞所見	α LBD (TR3) 転写促進活性	β LBD (TINUR) 転写促進活性
			RXR(+)	RXR(+)
Prostaglandin A ₂		1/3/10 μ M 10 μ Mで変形 30 μ Mで細胞障害	○ 10 μ M	○ 10 μ M
Prostaglandin A ₁		1/3/10 μ M 10 μ Mで変形 30 μ Mで細胞障害	○ 10 μ M	○ 10 μ M
16,16-dimethyl Prostaglandin A ₂		1/3/10 μ M 30 μ Mで細胞障害	X	X
Prostaglandin A ₃		1/3/10 μ M	X	X

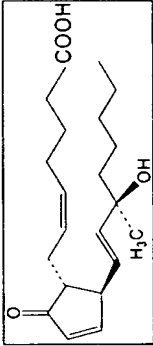
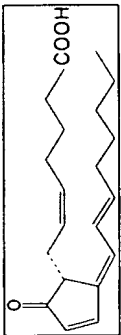
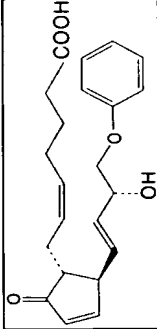
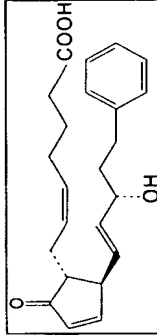
【0125】

【表 9】

Prostaglandin A ₁ ethyl ester		1/3/10 μ M 10 μ Mで変形	X	X
15-epi Prostaglandin A ₁		1/3/10 μ M	O 10 μ M	O 10 μ M
16,16-dimethyl Prostaglandin A ₁		1/3/10 μ M 10 μ Mで細胞障害	X	X
13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin A ₂		3/10/30 μ M	O 10 μ M	X

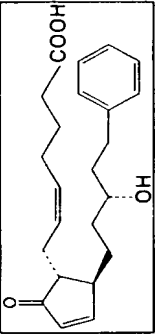
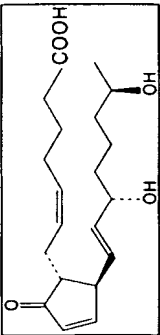
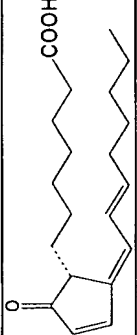
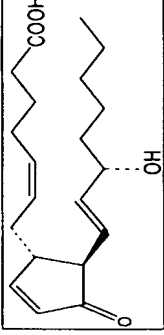
【0126】

【表 10】

15(R)-15-methyl Prostaglandin A ₂		1/3/10 μM 10 μMで変形 30 μMで細胞障害	○ 10 μM	○ 10 μM
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin A ₂		3/10/30 μM	×	×
16-phenoxy tetranor Prostaglandin A ₂		3/10/30 μM 30 μMで変形	×	○ 10 μM
17-phenyl trinor Prostaglandin A ₂		1/3/10 μM 10 μMで変形 30 μMで細胞障害	×	○ 10 μM

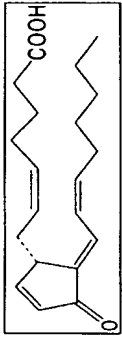
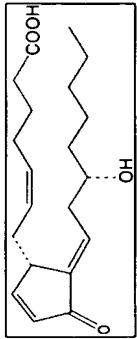
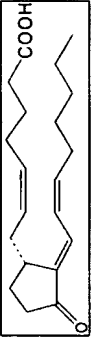
【0127】

【表 11】

17-phenyl trinor-13,14-dihydro Prostaglandin A ₂		3/10/30 μM	X	X
19(R)-hydroxy Prostaglandin A ₂		1/3/10 μM	X	X
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin A ₁		3/10/30 μM	X	X
Prostaglandin J ₂		1/3/10 μM 10 μMで変形	X	X

【0128】

【表 12】

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2		1/3/10 μ M 10 μ Mで変形	X	X
Δ^{12} -Prostaglandin J_2		1/3/10 μ M 10 μ Mで変形	\bigcirc 10 μ M	\bigcirc 3 μ M
9,10-dihydro-15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - Prostaglandin J_2 (CAY10410)		3/10/30 μ M	X	X

【0129】

[実施例 3] TINUR 遺伝子の発現解析

核内オーファン受容体サブファミリーの β タイプである TINUR については、臨床末梢血サンプルを用いた DD や ジーンチップ による発現比較解析からは選ばれてこなかった。この受容体についても、アレルギー疾患をはじめとする特定疾患との関連性は明らかになっていない。しかしながら、TR3 との機能的な類似性が予測されるので、TR3 と同様に例数が一群 10 例以上まとまった同じ患者末梢血好酸球パネル（表 5）において、ABI7700 で健常人と患者の発現比較を行った。TaqMan 法に使用したプライマーおよびプローブは次の通りである。

【0130】

Primer1(5') : AGCACAGGCTACGACGTCAA (配列番号：8)

Primer2(3') : TCTTCTACCTTAATGGAGGACTGC (配列番号：9)

TaqMan probe : TTGTACCAAATGCCCCTGTCCGGA (配列番号：10)

【0131】

表 13、図 5 に示すように、健常に比してアトピー性皮膚炎患者で、症例の強弱にはあまりかわりなく有意に亢進することが確認された。

【0132】

【表 13】

CIE-2 TINUR	Blood	beta-actin(raw) copy/ ng	TINUR(raw)		beta補正用 raw(/ng)/平均	TINUR補正 raw/beta補正
			copy/ 5 ng	copy/ 1 ng		
健常人13	1	253126		0	1.01130301	0
	2	541166	81382	16276	2.16209434	7528
	3	214239		0	0.855938946	0
	4	369621	136368	27274	1.476729393	18469
	5	716536		0	2.862741935	0
	6	169173		0	0.675887508	0
	7	601310	203504	40701	2.40238633	16942
	8	213062	78318	15664	0.851236036	18401
	9	371589	121882	24376	1.484591854	16420
	10	646297	105612	21122	2.582119848	8180
	11	208737	165619	33124	0.833956352	39719
	12	212114		0	0.84744903	0
	13	379539	112142	22428	1.516355526	14791
軽症15	14	508758	146688	29338	2.032618527	14433
	15	248937		0	0.994564691	0
	16	221813	414582	82916	0.886198604	93564
	17	315168	275505	55101	1.259174796	43760
	18	141827	279290	55858	0.566636769	98578
	19	244028	246709	49342	0.974953584	50609
	20	348051	332180	66436	1.390552351	47777
	21	387693	119505	23901	1.548931234	15431
	22	268468	144812	28962	1.072599907	27002
	23	206673	216900	43380	0.825709955	52537
	24	136652	228928	45786	0.545959033	83863
	25	218963	135292	27058	0.874812329	30930
	26	209273	198420	39684	0.836097009	47463
	27	131977		0	0.52728236	0
	28	121064	115898	23180	0.483680797	47923
中症 寛解期6	29	165901		0	0.662815331	0
	30	134119	273684	54737	0.535841346	102151
	31	86340		0	0.344949082	0
	32	472440	259151	51830	1.887519071	27459
	33	170914	151666	30333	0.682845244	44422
	34	367818	71428	14286	1.469525949	9721
中症 増悪期9	35	162258	519205	103841	0.648261218	160184
	36	90969		0	0.363443211	0
	37	246460	338300	67660	0.984671042	68713
	38	146805	221751	44350	0.586522301	75616
	39	179179	240130	48026	0.715863818	67088
	40	138858	107895	21579	0.554771366	38897
	41	133317	163876	32775	0.532635051	61534
	42	171308	333904	66781	0.684419966	97573
	43	285295	38321	7664	1.139827753	6724
	44	154902	121579	24316	0.618872876	39290
重症 寛解期10	45	78948	162181	32436	0.315418709	102835
	46	231612	402817	80563	0.925346905	87063
	47	155564	149795	29959	0.621516584	48203
	48	385848	148392	29678	1.541561787	19252
	49	264744	56146	11229	1.05772078	10616
	50	144715	194006	38801	0.578174465	67110
	51	205943	249286	49857	0.822795017	60595
	52	155395	157681	31536	0.62084169	50796
	53	151703		0	0.606092505	0
	54	397821		0	1.589395971	0
重症 増悪期8	55	446400	263974	52795	1.783480045	29602
	56	280724	54818	10964	1.121564845	9775
	57	161385	102355	20471	0.644775207	31749
	58	134978	85303	17061	0.539271624	31637
	59	24740	44743	8949	0.0988414	90534
	60	241793	322099	64420	0.966023991	66686
	61	93068	135613	27123	0.371831799	72943
	total	15268113				
	Av.	250297				

【0133】

【実施例 4】 TINUR受容体リガンドの探索

TINURもTR3と同様に核内オーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はまだわかっていない。もしもそれらが見出されれば、好酸球細胞内でダイレクトにTINURを活性化しアポトーシスを促進させることができると考えられる。従って、リガンド活性物質は抗アレルギー薬としての可能性が高いと考え、TR3と同じ手法でリガンドスクリーニングのためのハイスループット系を構築した。

【0134】

図2のように、pBINDの中にTINURのリガンド結合領域配列または全長遺伝子(図3)を挿入し、TINURとGAL4のDNA結合領域がin frameで融合したタンパク質が発現されるようにした。TINURのリガンド結合領域配列をpBINDに挿入したプラスミドとGAL4結合サイトをもったルシフェラーゼレポータープラスミドをNIH3T3細胞にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を自動測定するが、このときさらに、TINURと会合してヘテロダイマーを形成する転写因子であるretinoic acid X receptor (RXR) α 遺伝子を一緒に加えて活性を測定することも試みた。この系にさらに低分子物質を加えて、転写増強活性でスクリーニングを行うことができる。

【0135】

TINURもTR3と同じように、活性化した好酸球で発現が増強する。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。TR3の生体内リガンドがprostaglandin A₂、prostaglandin A₁であることがわかった。核内受容体サブファミリーのリガンドには構造的な冗長性があるはずである。そこで、TR3の活性化化合物と同様の誘導体を加え、転写活性の亢進を調べた。TINURについてはprostaglandin A₂、prostaglandin A₁、15-epi prostaglandin A₁、17-phenyl trinor prostaglandin A₂、delta12- prostaglandin J₂、15(R)-15-methyl prostaglandin A₂、16-phenoxy tetranor prostaglandin A₂等のシクロペンテノン構造をもったプロスタグランジンに、転写を活性化させる作用があることを見出した(図6および表8~12)。これらの反応は再現性があること、prostaglandin A₂周辺化合物に構造活性相関があることから、prostaglandin A₂、prostaglandin A₁等の化合物およびその近辺の代謝物は、TR3のみならず

TINURの生体内リガンドとしての可能性が高いことが明らかになった。

【0136】

【発明の効果】

本発明により、アトピー性皮膚炎患者の活性化した好酸球において発現に差の
見られる遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標にすることにより、
アレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングを行うこと
が可能となった。

本発明におけるアレルギー性疾患関連遺伝子は、アレルゲンの種類にかかわら
ず、簡便にその発現レベルを知ることができる。従って、アレルギー反応の病態
を総合的に把握することができる。

【0137】

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、末梢血好酸球を試料としてその
発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。遺伝子解
析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。従って本発明に
よるアレルギー性疾患の検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診
断方法となることが期待される。この意味で本発明の方法の診断的価値は高い。

【0138】

更に、本発明のスクリーニング方法は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床マー
カーである好酸球の増減と密接に関連する遺伝子機能を指標として実施される。
従って、このスクリーニング方法によって見出すことができる化合物は、幅広い
アレルギーの病態制御に有用であると期待できる。

また本発明により提供されるアレルギー性疾患治療薬は、TR3またはTINURの活
性化とそれに伴う好酸球のアポトーシス誘導という全く新しい作用機序をもった
医薬品として有用である。

【0139】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Genox Research, Inc.

National Center for Child Health and Development

<120> Methods for examination for allergic diseases, and
drugs for treating allergic diseases

<130> G1-A0211

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (111)..(1904)

<400> 1

cggaacttg ggggagtgca cagaagaact tcgggagcgc acgcgggacc agggaccagg 60

ctgagactcg gggcgccagt ccgggcaggg gcagcgggac gcggccggag atg ccc 116

Met Pro

1

tgt atc caa gcc caa tat ggg aca cca gca ccg agt ccg gga ccc cgt 164

Cys Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly Pro Arg

5

10

15

gac cac ctg gca agc gac ccc ctg acc cct gag ttc atc aag ccc acc 212

Asp His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys Pro Thr

20

25

30

atg gac ctg gcc agc ccc gag gca gcc ccc gct gcc ccc act gcc ctg 260

Met Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr Ala Leu

35

40

45

50

ccc agc ttc agc acg ttc atg gac ggc tac aca gga gag ttt gac acc 308

Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe Asp Thr

55

60

65

ttc ctc tac cag ctg cca gga aca gtc cag cca tgc tcc tca gcc tcc 356

Phe Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser Ala Ser

70

75

80

tcc tcg gcc tcc tcc aca tcc tcg tcc tca gcc acc tcc cct gcc tct 404

Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Pro Ala Ser

85

90

95

gcc tcc ttc aag ttc gag gac ttc cag gtg tac ggc tgc tac ccc ggc 452

Ala Ser Phe Lys Phe Glu Asp Phe Gln Val Tyr Gly Cys Tyr Pro Gly

100

105

110

ccc ctg agc ggc cca gtg gat gag gcc ctg tcc tcc agt ggc tct gac 500

Pro Leu Ser Gly Pro Val Asp Glu Ala Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asp

115 120 125 130

tac tat ggc agc ccc tgc tcg gcc ccg tcg ccc tcc acg ccc agc ttc 548

Tyr Tyr Gly Ser Pro Cys Ser Ala Pro Ser Pro Ser Thr Pro Ser Phe

135 140 145

cag ccg ccc cag ctc tct ccc tgg gat ggc tcc ttc ggc cac ttc tcg 596

Gln Pro Pro Gln Leu Ser Pro Trp Asp Gly Ser Phe Gly His Phe Ser

150 155 160

ccc agc cag act tac gaa ggc ctg cgg gca tgg aca gag cag ctg ccc 644

Pro Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln Leu Pro

165 170 175

aaa gcc tct ggg ccc cca cag cct cca gcc ttc ttt tcc ttc agt cct 692

Lys Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe Ser Pro

180 185 190

ccc act ggc ccc agc ccc agc ctg gcc cag agc ccc ctg aag ttg ttc 740

Pro Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys Leu Phe

195 200 205 210

ccc tca cag gcc acc cac cag ctg ggg gag gga gag agc tat tcc atg 788

Pro Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Met

215 220 225

cct acg gcc ttc cca ggt ttg gca ccc act tct cca cac ctt gag ggc 836

Pro Thr Ala Phe Pro Gly Leu Ala Pro Thr Ser Pro His Leu Glu Gly

230

235

240

tcg ggg ata ctg gat aca ccc gtg acc tca acc aag gcc cgg agc ggg 884

Ser Gly Ile Leu Asp Thr Pro Val Thr Ser Thr Lys Ala Arg Ser Gly

245

250

255

gcc cca ggt cca agt gaa ggc cgc tgt gct gtg tgt ggg gac aac gct 932

Ala Pro Gly Pro Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala

260

265

270

tca tgc cag cat tat ggt gtc cgc aca tgt gag ggc tgc aag ggc ttc 980

Ser Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe

275

280

285

290

ttc aag cgc aca gtg cag aaa aac gcc aag tac atc tgc ctg gct aac 1028

Phe Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Ile Cys Leu Ala Asn

295

300

305

aag gac tgc cct gtg gac aag agg cgg cga aac cgc tgc cag ttc tgc 1076

Lys Asp Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Phe Cys

310

315

320

cgc ttc cag aag tgc ctg gcg gtg ggc atg gtg aag gaa gtt gtc cga 1124

Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg

325

330

335

aca gac agc ctg aag ggg cgg cgg ggc cga cct tca aaa ccc aag 1172

Thr Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys

340	345	350	
cag ccc cca gat gcc tcc cct gcc aat ctc ctc act tcc ctg gtc ctt			1220
Gln Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ala Asn Leu Leu Thr Ser Leu Val Leu			
355	360	365	370
gca cac ctg gat tca ggg ccc agc act gcc aaa ctg gac tac tcc aag			1268
Ala His Leu Asp Ser Gly Pro Ser Thr Ala Lys Leu Asp Tyr Ser Lys			
	375	380	385
ttc cag gag ctg gtg ctg ccc cac ttt ggg aag gaa gat gct ggg gat			1316
Phe Gln Glu Leu Val Leu Pro His Phe Gly Lys Glu Asp Ala Gly Asp			
	390	395	400
gta cag cag ttc tac gac ctg ctc tcc ggt tct ctg gag gtc atc cga			1364
Val Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Ser Gly Ser Leu Glu Val Ile Arg			
	405	410	415
aag tgg gcg gag aag atc cct ggc ttt gct gag ctg tca ccg gct gac			1412
Lys Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Glu Leu Ser Pro Ala Asp			
	420	425	430
cag gac ctg ttg ctg gag tcg gcc ttc ctg gag ctc ttc atc ctc cgc			1460
Gln Asp Leu Leu Leu Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Ile Leu Arg			
	435	440	445
ctg gcg tac agg tct aag cca ggc gag ggc aag ctc atc ttc tgc tca			1508
Leu Ala Tyr Arg Ser Lys Pro Gly Glu Gly Lys Leu Ile Phe Cys Ser			
	455	460	465

ggc ctg gtg cta cac cgg ctg cag tgt gcc cgt ggc ttc ggg gac tgg 1556
Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Ala Arg Gly Phe Gly Asp Trp

470

475

480

att gac agt atc ctg gcc ttc tca agg tcc ctg cac agc ttg ctt gtc 1604
Ile Asp Ser Ile Leu Ala Phe Ser Arg Ser Leu His Ser Leu Leu Val

485

490

495

gat gtc cct gcc ttc gcc tgc ctc tct gcc ctt gtc ctc atc acc gac 1652
Asp Val Pro Ala Phe Ala Cys Leu Ser Ala Leu Val Leu Ile Thr Asp

500

505

510

cgg cat ggg ctg cag gag ccg cgg cgg gtg gag gag ctg cag aac cgc 1700
Arg His Gly Leu Gln Glu Pro Arg Arg Val Glu Glu Leu Gln Asn Arg

515

520

525

530

atc gcc agc tgc ctg aag gag cac gtg gca gct gtg gcg ggc gag ccc 1748
Ile Ala Ser Cys Leu Lys Glu His Val Ala Ala Val Ala Gly Glu Pro

535

540

545

cag cca gcc agc tgc ctg tca cgt ctg ttg ggc aaa ctg ccc gag ctg 1796
Gln Pro Ala Ser Cys Leu Ser Arg Leu Leu Gly Lys Leu Pro Glu Leu

550

555

560

cgg acc ctg tgc acc cag ggc ctg cag cgc atc ttc tac ctc aag ctg 1844
Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu

565

570

575

gag gac ttg gtg ccc cct cca ccc atc att gac aag atc ttc atg gac 1892

Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Pro Ile Ile Asp Lys Ile Phe Met Asp

580

585

590

acg ctg ccc ttc tgaccctgc ctgggaacac gtgtgcacat gcgcactctc 1944

Thr Leu Pro Phe

595

atatgccacc ccatgtgcct ttagtccacg gacccccaga gcacccccaa gcctgggctt 2004

gagctgcaga atgactccac cttctcacct gctccaggag gtttgcaggg agctcaagcc 2064

cttggggagg gggatgcctt catgggggtg accccacgat ttgtcttacc cccccagcc 2124

tggccccggc ctttatgttt tttgtaagat aaaccgtttt taacacatag cgccgtgctg 2184

taaataagcc cagtgtgct gtaaatacag gaagaaagag cttgaggtgg gagcggggct 2244

gggaggaagg gatgggcccc gccttcctgg gcagcctttc cagcctcctg cctggctctc 2304

tcttctacc ctcttccac atgtacataa actgtcactc taggaagaag acaaatgaca 2364

gattctgaca tttatatttg tgtattttcc tggatttata gtatgtgact tttctgatta 2424

atatatttaa tatattgaat aaaaaataga catgtagttg 2464

<210> 2

<211> 598

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Cys Ile Gln Ala Gln Tyr Gly Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly

1 5 10 15

Pro Arg Asp His Leu Ala Ser Asp Pro Leu Thr Pro Glu Phe Ile Lys

20 25 30

Pro Thr Met Asp Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Pro Ala Ala Pro Thr

35 40 45

Ala Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Phe

50 55 60

Asp Thr Phe Leu Tyr Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Pro Cys Ser Ser

65 70 75 80

Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Pro

85 90 95

Ala Ser Ala Ser Phe Lys Phe Glu Asp Phe Gln Val Tyr Gly Cys Tyr

100 105 110

Pro Gly Pro Leu Ser Gly Pro Val Asp Glu Ala Leu Ser Ser Ser Gly

115 120 125

Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Pro Cys Ser Ala Pro Ser Pro Ser Thr Pro

130

135

140

Ser Phe Gln Pro Pro Gln Leu Ser Pro Trp Asp Gly Ser Phe Gly His

145

150

155

160

Phe Ser Pro Ser Gln Thr Tyr Glu Gly Leu Arg Ala Trp Thr Glu Gln

165

170

175

Leu Pro Lys Ala Ser Gly Pro Pro Gln Pro Pro Ala Phe Phe Ser Phe

180

185

190

Ser Pro Pro Thr Gly Pro Ser Pro Ser Leu Ala Gln Ser Pro Leu Lys

195

200

205

Leu Phe Pro Ser Gln Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Gly Glu Ser Tyr

210

215

220

Ser Met Pro Thr Ala Phe Pro Gly Leu Ala Pro Thr Ser Pro His Leu

225

230

235

240

Glu Gly Ser Gly Ile Leu Asp Thr Pro Val Thr Ser Thr Lys Ala Arg

245

250

255

Ser Gly Ala Pro Gly Pro Ser Glu Gly Arg Cys Ala Val Cys Gly Asp

260

265

270

Asn Ala Ser Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys

275

280

285

Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Ile Cys Leu
290 295 300

Ala Asn Lys Asp Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln
305 310 315 320

Phe Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val
325 330 335

Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys
340 345 350

Pro Lys Gln Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ala Asn Leu Leu Thr Ser Leu
355 360 365

Val Leu Ala His Leu Asp Ser Gly Pro Ser Thr Ala Lys Leu Asp Tyr
370 375 380

Ser Lys Phe Gln Glu Leu Val Leu Pro His Phe Gly Lys Glu Asp Ala
385 390 395 400

Gly Asp Val Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Ser Gly Ser Leu Glu Val
405 410 415

Ile Arg Lys Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Glu Leu Ser Pro
420 425 430

Ala Asp Gln Asp Leu Leu Leu Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Ile
435 440 445

Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Lys Pro Gly Glu Gly Lys Leu Ile Phe
450 455 460

Cys Ser Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Ala Arg Gly Phe Gly
465 470 475 480

Asp Trp Ile Asp Ser Ile Leu Ala Phe Ser Arg Ser Leu His Ser Leu
485 490 495

Leu Val Asp Val Pro Ala Phe Ala Cys Leu Ser Ala Leu Val Leu Ile
500 505 510

Thr Asp Arg His Gly Leu Gln Glu Pro Arg Arg Val Glu Glu Leu Gln
515 520 525

Asn Arg Ile Ala Ser Cys Leu Lys Glu His Val Ala Ala Val Ala Gly
530 535 540

Glu Pro Gln Pro Ala Ser Cys Leu Ser Arg Leu Leu Gly Lys Leu Pro
545 550 555 560

Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu
565 570 575

Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Pro Ile Ile Asp Lys Ile Phe
580 585 590

Met Asp Thr Leu Pro Phe

595

<210> 3

<211> 3427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (318)..(2111)

<400> 3

gctcgcgcac ggctccgcgg tcccttttgc ctgtccagcc ggccgcctgt ccctgctccc 60

tccctccgtg agtgtccggg ttcccttcgc ccagctctcc caccctacc cgaccccggc 120

gcccgggctc ccagagggaa ctgcattcg gcagagttga atgaatgaag agagacgcgg 180

agaactccta aggaggagat tggacaggct ggactcccca ttgcttttct aaaaatcttg 240

gaaactttgt ccttcattga attacgacac tgtccacctt taatttcctc gaaaacgcct 300

gtaactcggc tgaagcc atg cct tgt gtt cag gcg cag tat ggg tcc tcg 350

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser

1

5

10

cct caa gga gcc agc ccc gct tct cag agc tac agt tac cac tct tcg 398

Pro Gln Gly Ala Ser Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser

15	20	25	
gga gaa tac agc tcc gat ttc tta act cca gag ttt gtc aag ttt agc			446
Gly Glu Tyr Ser Ser Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser			
30	35	40	
atg gac ctc acc aac act gaa atc act gcc acc act tct ctc ccc agc			494
Met Asp Leu Thr Asn Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser			
45	50	55	
ttc agt acc ttt atg gac aac tac agc aca ggc tac gac gtc aag cca			542
Phe Ser Thr Phe Met Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro			
60	65	70	75
cct tgc ttg tac caa atg ccc ctg tcc gga cag cag tcc tcc att aag			590
Pro Cys Leu Tyr Gln Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys			
80	85	90	
gta gaa gac att cag atg cac aac tac cag caa cac agc cac ctg ccc			638
Val Glu Asp Ile Gln Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro			
95	100	105	
ccc cag tct gag gag atg atg ccg cac tcc ggg tcg gtt tac tac aag			686
Pro Gln Ser Glu Glu Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys			
110	115	120	
ccc tcc tcg ccc ccg acg ccc acc acc ccg ggc ttc cag gtg cag cac			734
Pro Ser Ser Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His			
125	130	135	

agc ccc atg tgg gac gac ccg gga tct ctc cac aac ttc cac cag aac 782

Ser Pro Met Trp Asp Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn

140 145 150 155

tac gtg gcc act acg cac atg atc gag cag agg aaa acg cca gtc tcc 830

Tyr Val Ala Thr Thr His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser

160 165 170

cgc ctc tcc ctc ttc tcc ttt aag caa tcg ccc cct ggc acc ccg gtg 878

Arg Leu Ser Leu Phe Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val

175 180 185

tct agt tgc cag atg cgc ttc gac ggg ccc ctg cac gtc ccc atg aac 926

Ser Ser Cys Gln Met Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn

190 195 200

ccg gag ccc gcc ggc agc cac cac gtg gtg gac ggg cag acc ttc gct 974

Pro Glu Pro Ala Gly Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala

205 210 215

gtg ccc aac ccc att cgc aag ccc gcg tcc atg ggc ttc ccg ggc ctg 1022

Val Pro Asn Pro Ile Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu

220 225 230 235

cag atc ggc cac gcg tct cag ctg ctc gac acg cag gtg ccc tca ccg 1070

Gln Ile Gly His Ala Ser Gln Leu Leu Asp Thr Gln Val Pro Ser Pro

240 245 250

ccg tcg cgg ggc tcc ccc tcc aac gag ggg ctg tgc gct gtg tgt ggg 1118

Pro Ser Arg Gly Ser Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly

255

260

265

gac aac gcg gcc tgc caa cac tac ggc gtg cgc acc tgt gag ggc tgc 1166

Asp Asn Ala Ala Cys Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys

270

275

280

aaa ggc ttc ttt aag cgc aca gtg caa aaa aat gca aaa tac gtg tgt 1214

Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys

285

290

295

tta gca aat aaa aac tgc cca gtg gac aag cgt cgc cgg aat cgc tgt 1262

Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys

300

305

310

315

cag tac tgc cga ttt cag aag tgc ctg gct gtt ggg atg gtc aaa gaa 1310

Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu

320

325

330

gtg gtt cgc aca gac agt tta aaa ggc cgg aga ggt cgt ttg ccc tcg 1358

Val Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser

335

340

345

aaa ccg aag agc cca cag gag ccc tct ccc cct tcg ccc ccg gtg agt 1406

Lys Pro Lys Ser Pro Gln Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser

350

355

360

ctg atc agt gcc ctc gtc agg gcc cat gtc gac tcc aac ccg gct atg 1454

Leu Ile Ser Ala Leu Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met

365

370

375

acc agc ctg gac tat tcc agg ttc cag gcg aac cct gac tat caa atg 1502

Thr Ser Leu Asp Tyr Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met

380

385

390

395

agt gga gat gac acc cag cat atc cag caa ttc tat gat ctc ctg act 1550

Ser Gly Asp Asp Thr Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr

400

405

410

ggc tcc atg gag atc atc cgg ggc tgg gca gag aag atc cct ggc ttc 1598

Gly Ser Met Glu Ile Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe

415

420

425

gca gac ctg ccc aaa gcc gac caa gac ctg ctt ttt gaa tca gct ttc 1646

Ala Asp Leu Pro Lys Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe

430

435

440

tta gaa ctg ttt gtc ctt cga tta gca tac agg tcc aac cca gtg gag 1694

Leu Glu Leu Phe Val Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu

445

450

455

ggt aaa ctc atc ttt tgc aat ggg gtg gtc ttg cac agg ttg caa tgc 1742

Gly Lys Leu Ile Phe Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys

460

465

470

475

gtt cgt ggc ttt ggg gaa tgg att gat tcc att gtt gaa ttc tcc tcc 1790

Val Arg Gly Phe Gly Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser

480	485	490	
aac ttg cag aat atg aac atc gac att tct gcc ttc tcc tgc att gct			1838
Asn Leu Gln Asn Met Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala			
495	500	505	
gcc ctg gct atg gtc aca gag aga cac ggg ctc aag gaa ccc aag aga			1886
Ala Leu Ala Met Val Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg			
510	515	520	
gtg gaa gaa ctg caa aac aag att gta aat tgt ctc aaa gac cac gtg			1934
Val Glu Glu Leu Gln Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val			
525	530	535	
act ttc aac aat ggg ggg ttg aac cgc ccc aat tat ttg tcc aaa ctg			1982
Thr Phe Asn Asn Gly Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu			
540	545	550	555
ttg ggg aag ctc cca gaa ctt cgt acc ctt tgc aca cag ggg cta cag			2030
Leu Gly Lys Leu Pro Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln			
560	565	570	
cgc att ttc tac ctg aaa ttg gaa gac ttg gtg cca ccg cca gca ata			2078
Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile			
575	580	585	
att gac aaa ctt ttc ctg gac act tta cct ttc taagacctcc tccaagcac			2131
Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp Thr Leu Pro Phe			
590	595		

ttcaaaggaa ctggaatgat aatggaaact gtcaagaggg ggcaagtcac atgggcagag 2191

atagccgtgt gagcagtctc agctcaagct gccccccatt tctgtaacce tcttagcccc 2251

cttgatccct aaagaaaaca aacaaacaaa caaaaactgt tgctatttcc taacctgcag 2311

gcagaacctg aaagggcatt ttggctccgg ggcatcctgg atttagaaca tggactacac 2371

acaatacagt ggtataaact ttttattctc agtttaaaaa tcagtttggt gttcagaaga 2431

aagattgcta taaggtataa tgggaaatgt ttggccatgc ttggttggtg cagttcagac 2491

aatgtaaca cacacacaca tacacacaca cacacacaca gagacacatc ttaaggggac 2551

ccacaagtat tgccctttaa caagacttca aagttttctg ctgtaaagaa agctgtaata 2611

tatagtaaaa ctaaagtgtg cgtgggtggc atgagttgaa gaaggcaaag gcttgtaaat 2671

ttaccaatg cagtttggct ttttaatta ttttgtgcct atttatgaat aaatattaca 2731

aattctaaaa gataagtgtg tttgcaaaaa aaaagaaaat aaatacataa aaaagggaca 2791

agcatgttga ttctaggttg aaaatgttat aggcacttgc tacttcagta atgtctatat 2851

tatataaata gtatttcaga cactatgtag tctgttagat tttataaaga ttggtagtta 2911

tctgagctta aacattttct caattgtaaa ataggtgggc acaagtatta cacatcagaa 2971

aatcctgaca aaagggacac atagtgtttg taacaccgtc caacattcct tgtttgtaag 3031

tgttgtatgt accgttgatg ttgataaaaa gaaagtttat atcttgatta ttttgttgtc 3091

taaagctaaa caaaacttgc atgcagcagc ttttgactgt ttccagagtg cttataatat 3151

acataactcc ctggaaataa ctgagcactt tgaatTTTTT ttatgtctaa aattgtcagt 3211

taatttatta ttttgtttga gtaagaattt taatattgcc atattctgta gtatttttct 3271

ttgtatatatt ctagtatggc acatgatatg agtcactgcc tttttttcta tgggtgatga 3331

cagttagaga tgctgatttt ttttctgata aattctttct ttgagaaaga caattttaat 3391

gtttacaaca ataaaccatg taaatgaaaa aaaaaa 3427

<210> 4

<211> 598

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Gly Ala Ser

1

5

10

15

Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser Gly Glu Tyr Ser Ser

20

25

30

Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser Met Asp Leu Thr Asn
35 40 45

Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met
50 55 60

Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile Gln
85 90 95

Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu Glu
100 105 110

Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Pro
115 120 125

Thr Pro Thr Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp Asp
130 135 140

Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr Thr
145 150 155 160

His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu Phe
165 170 175

Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln Met
180 185 190

Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn Pro Glu Pro Ala Gly
195 200 205

Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Val Pro Asn Pro Ile
210 215 220

Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu Gln Ile Gly His Ala
225 230 235 240

Ser Gln Leu Leu Asp Thr Gln Val Pro Ser Pro Pro Ser Arg Gly Ser
245 250 255

Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys
260 265 270

Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys
275 280 285

Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn
290 295 300

Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe
305 310 315 320

Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp
325 330 335

Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro

340

345

350

Gln Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala Leu

355

360

365

Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp Tyr

370

375

380

Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met Ser Gly Asp Asp Thr

385

390

395

400

Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Ser Met Glu Ile

405

410

415

Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Asp Leu Pro Lys

420

425

430

Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val

435

440

445

Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu Gly Lys Leu Ile Phe

450

455

460

Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe Gly

465

470

475

480

Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn Met

485

490

495

Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met Val
500 505 510

Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Gln
515 520 525

Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val Thr Phe Asn Asn Gly
530 535 540

Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu Leu Gly Lys Leu Pro
545 550 555 560

Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu
565 570 575

Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile Ile Asp Lys Leu Phe
580 585 590

Leu Asp Thr Leu Pro Phe
595

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 5

ccactttggg aaggaagatg ct

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

actttcggat gacctccaga ga

22

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM

<220>

<221> misc_binding

<222> (30)

<223> Label TAMRA

<400> 7

atgtacagca gttctacgac ctgctctccg

30

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

agcacaggct acgacgtcaa

20

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

tcttctacct taatggagga ctgc

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<400> 10

ttgtacaaa tgcccctgtc cgga

24

<210> 11

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

ggccagtga ttgtaatacg actcactata gggaggcggt tttttttttt tttttttttt 60

ttt

63

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

tcacccacac tgtgcccatc tacga

25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 13

cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM

<220>

<221> misc_binding

<222> (7)

<223> Label TAMRA

<400> 14

atgccctccc ccatgccatc ctgcgt

26

【図面の簡単な説明】

【図 1】 表 6 をグラフ化した図である。

【図 2】 本発明者らによって構築された TR3 または TINUR 受容体のリガンド探索系を模式的に示す図である。X に TR3 または TINUR のリガンド結合部位、Y に retinoic acid X receptor (RXR) α の全長遺伝子を挿入する。これらを NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、誘導されてくるルシフェラーゼの活性を測定する。

【図 3】 TR3 または TINUR 受容体タンパク質の構造を模式的に示す図である。

【図 4】 図 2 のシステムを用いたときの一連のシクロペンテノンプロスタグランジン群の、TR3 の転写活性化作用を示す図である。

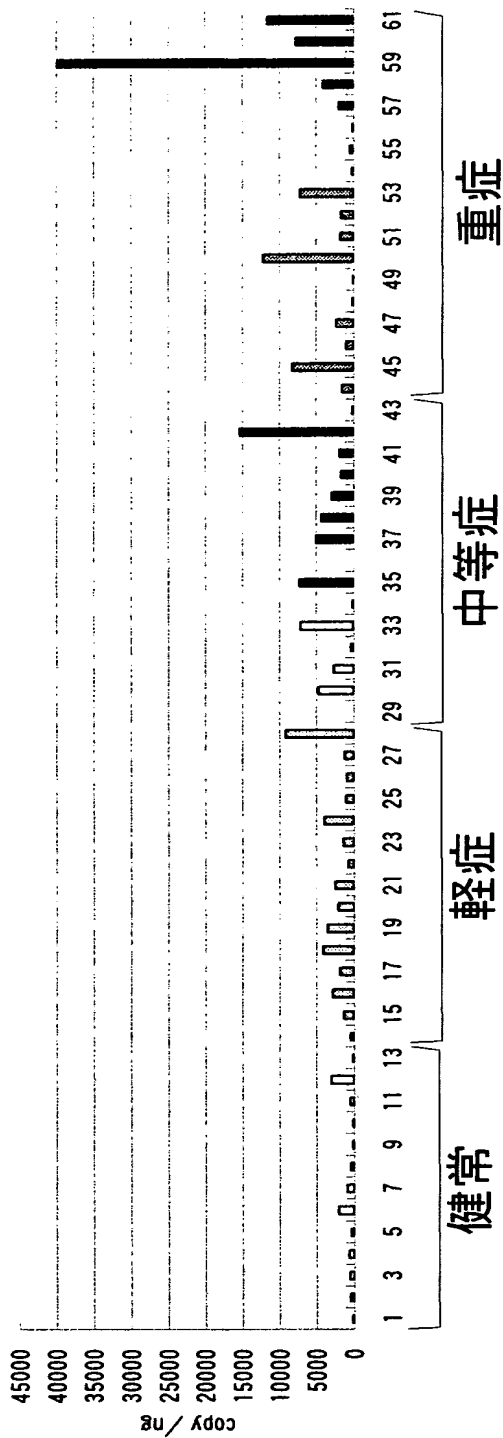
【図 5】 ABI7700 で健常人と患者の TINUR 遺伝子の発現量を測定した結果を示す図である。

【図 6】 図 2 のシステムを用いたときの一連のシクロペンテノンプロスタグランジン群の、TINUR 遺伝子の転写活性化作用を示す図である。

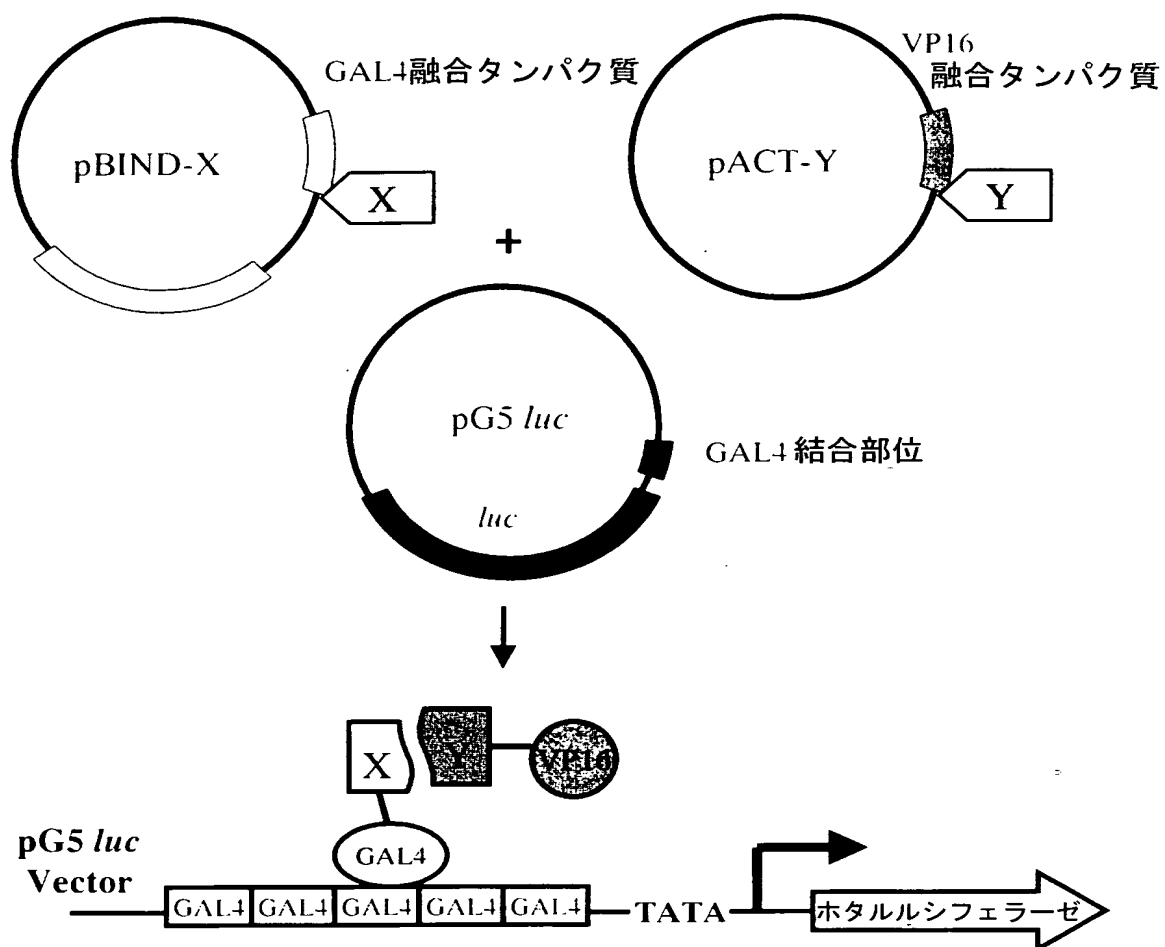
【書類名】 図面

【図 1】

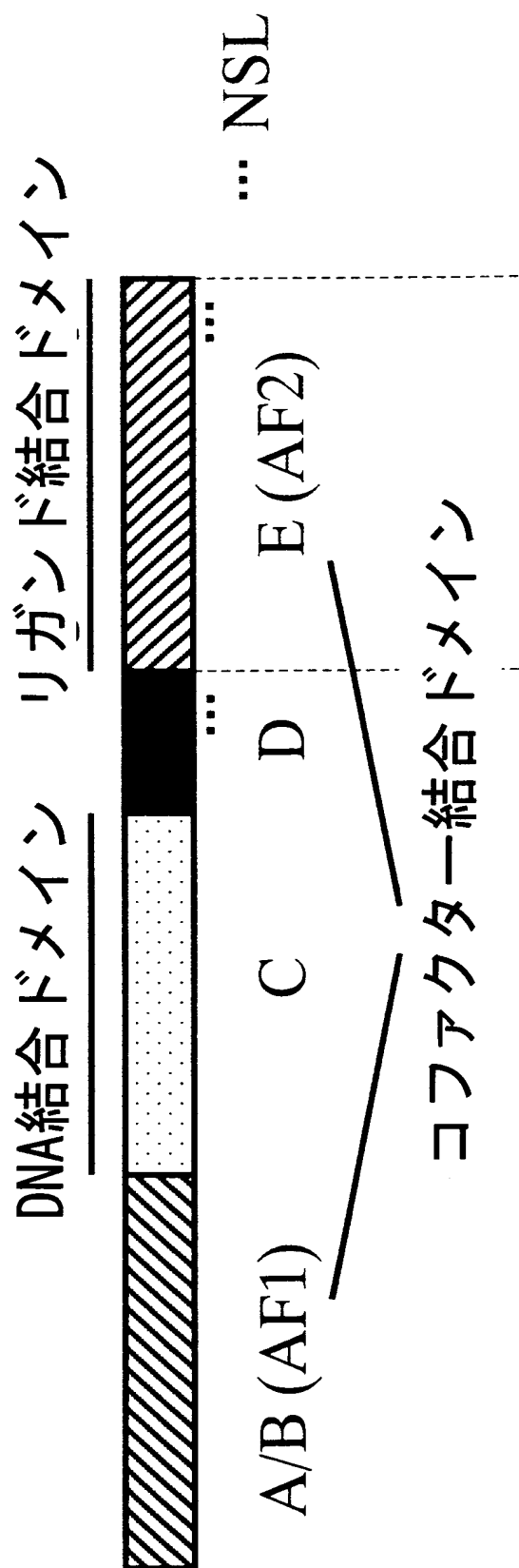
L13740 (Beta-actin補正)



【図 2】

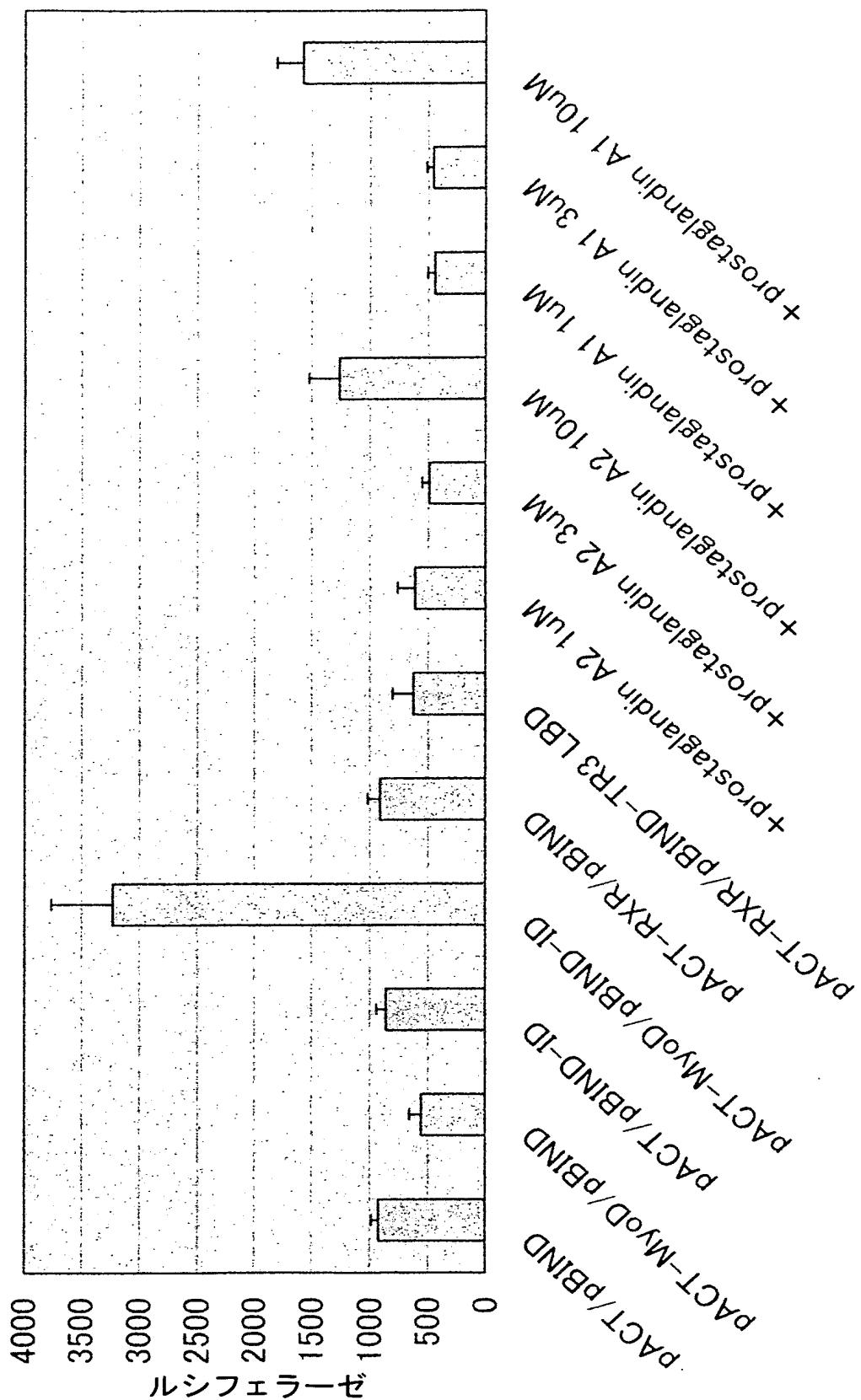


【図 3】

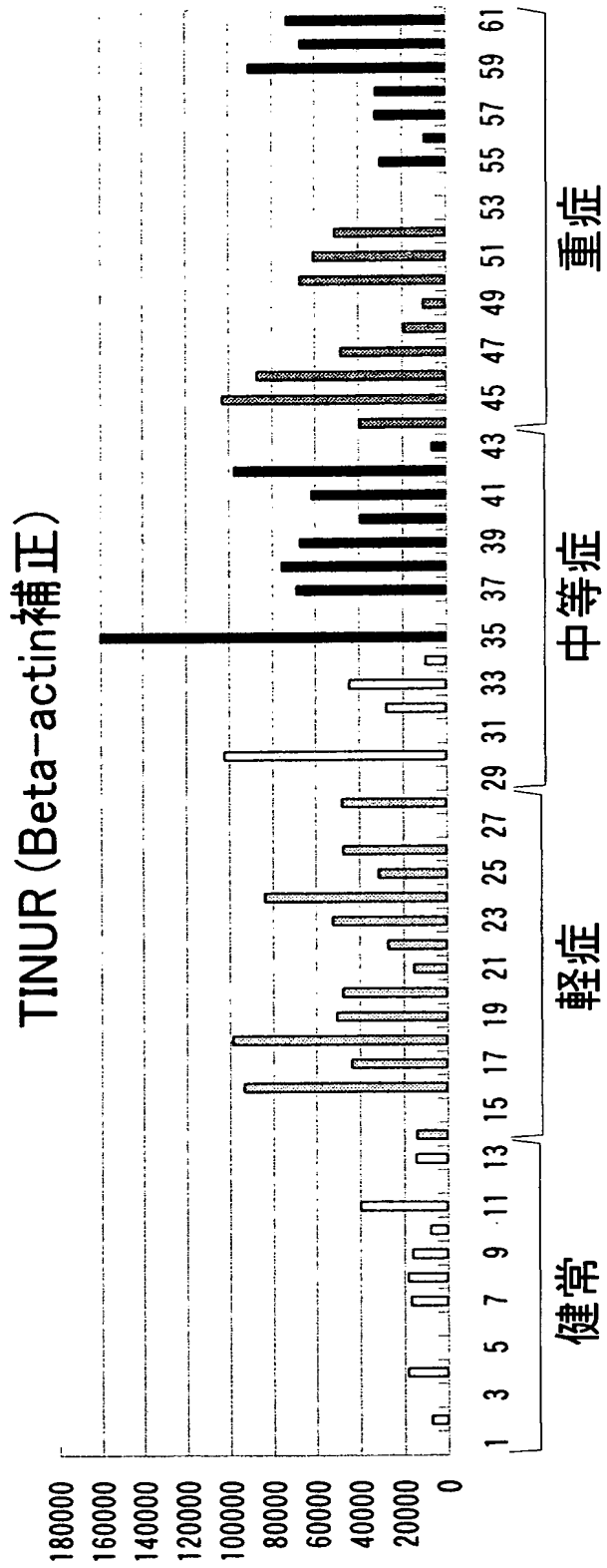


【図 4】

NIH3T3 pACT-RXR α /pBIND-TR3 リガンド結合ドメイン (LBD)

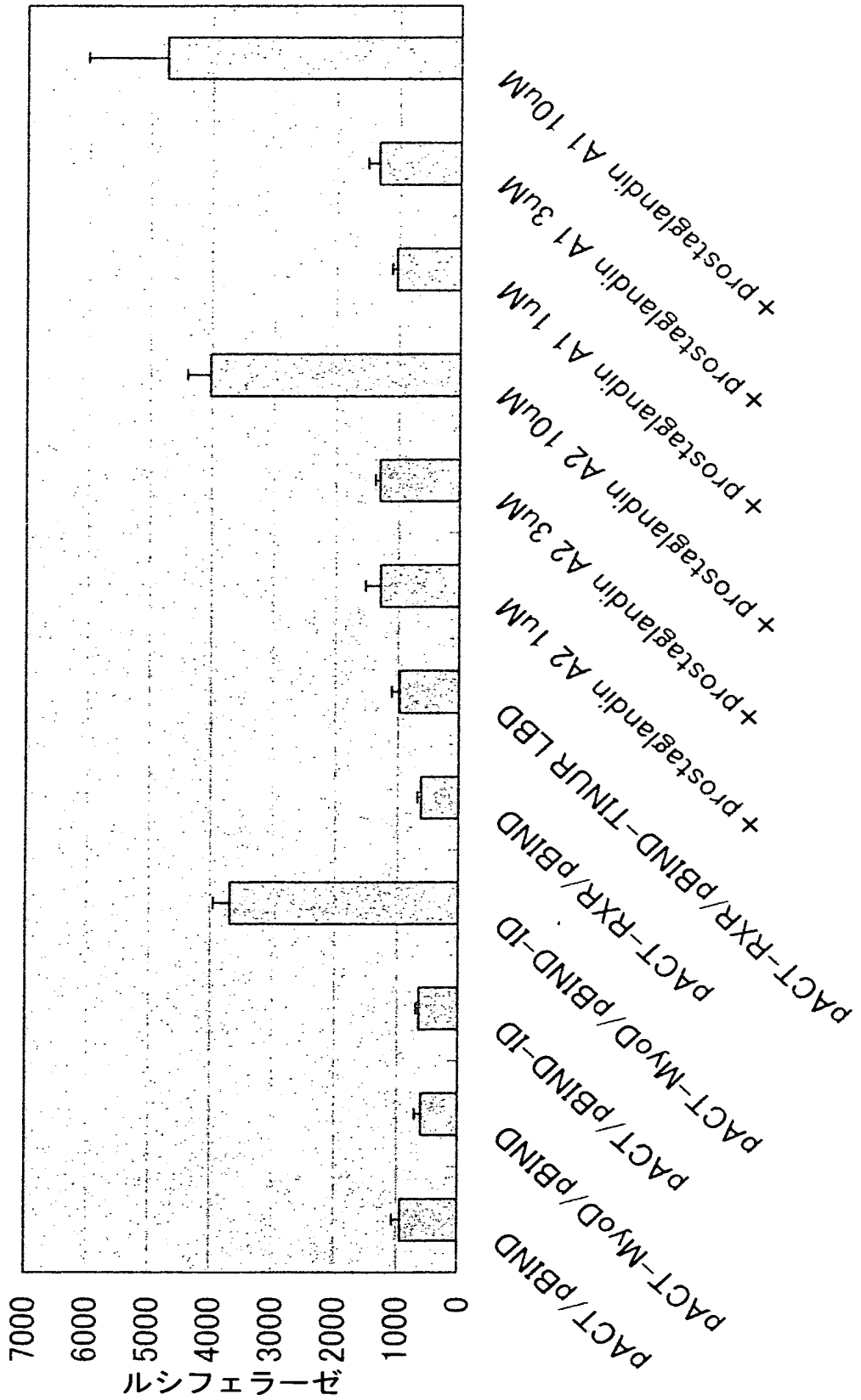


【図 5】



【図 6】

NIH3T3 pACT-RXR α /pBIND-TINUR リガンド結合ドメイン (LBD)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤の提供を課題とする。

【解決手段】 アトピー性皮膚炎患者の活性化した好酸球において発現に差が見られる遺伝子を、ジーンチップを用いてディファレンシャルな発現比較解析を行った。その結果、活性化した好酸球において、有意に発現が上昇しているTR3およびTINUR遺伝子を同定することに成功した。本発明者らは、該遺伝子をアレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 G1-A0211
【提出日】 平成14年 7月 4日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-193841
【補正をする者】
 【識別番号】 597177471
 【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】**【補正対象書類名】** 特許願**【補正対象項目名】** 特許出願人**【補正方法】** 変更**【補正の内容】****【特許出願人】****【識別番号】** 597177471**【氏名又は名称】** 株式会社ジェノックス創薬研究所**【特許出願人】****【識別番号】** 502196050**【氏名又は名称】** 国立成育医療センター総長

【その他】 本補正書で補正する理由は、特許出願人の住所を「東京都世田谷区大蔵 2 丁目 1 0 - 1」、名称を「国立成育医療センター総長」と記載すべきところを、誤って「東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1」「国立成育医療センター」と記載してしまった為であります。

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-193841
受付番号	50200978482
書類名	手続補正書
担当官	駒崎 利徳 8640
作成日	平成 14 年 7 月 10 日

< 認定情報・付加情報 >

【補正をする者】

【識別番号】 597177471

【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台 5-1-3

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

次頁無

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 G1-A0211

【提出日】 平成14年 7月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-193841

【補正をする者】

【識別番号】 597177471

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

【識別番号】 502196050

【氏名又は名称】 国立成育医療センター総長

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 その他

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【その他】 国以外の全ての者の持分の割合 0 5 0 / 1 0 0

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 1 9 3 8 4 1
受付番号	5 0 2 0 1 1 1 4 5 3 4
書類名	手続補正書
担当官	駒崎 利徳 8 6 4 0
作成日	平成 1 4 年 9 月 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【補正をする者】

【識別番号】	597177471
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台 5 - 1 - 3
【氏名又は名称】	株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

【識別番号】	502196050
【住所又は居所】	東京都世田谷区大蔵 2 丁目 1 0 - 1
【氏名又は名称】	国立成育医療センター総長

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

次頁無

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 G1-A0211

【提出日】 平成14年11月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2002-193841

【補正をする者】

 【識別番号】 597177471

 【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

 【識別番号】 502196050

 【氏名又は名称】 国立成育医療センター総長

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】**【補正対象書類名】** 特許願**【補正対象項目名】** 発明者**【補正方法】** 変更**【補正の内容】****【発明者】****【住所又は居所】** 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内**【氏名】** 橋田 亮一**【発明者】****【住所又は居所】** 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内**【氏名】** 加賀谷 伸治**【発明者】****【住所又は居所】** 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内**【氏名】** 杉田 雄二**【発明者】****【住所又は居所】** 東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1 国立成育医療センター研究所内**【氏名】** 斎藤 博久**【その他】** 誤記の理由は、発明者を、「橋田亮一」「加賀谷伸治」「杉田雄二」「斎藤博久」の 4 名を記載すべきところを出願時に誤って「橋田亮一」「加賀谷伸治」「杉田雄二」「斎藤博久」「大倉永也」と記載してしまった為であります。**【プルーフの要否】** 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 1 9 3 8 4 1
受付番号	5 0 2 0 1 8 1 0 4 4 1
書類名	手続補正書
担当官	駒崎 利徳 8 6 4 0
作成日	平成 1 5 年 1 月 1 6 日

< 認定情報・付加情報 >

【補正をする者】

【識別番号】 597177471

【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台 5 - 1 - 3

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

【識別番号】 502196050

【住所又は居所】 東京都世田谷区大蔵 2 丁目 1 0 - 1

【氏名又は名称】 国立成育医療センター総長

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

次頁無

特願 2 0 0 2 - 1 9 3 8 4 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 7 1 7 7 4 7 1]

1. 変更年月日

1 9 9 7 年 1 2 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市東光台 5 - 1 - 3

氏 名

株式会社ジェノックス創薬研究所

特願 2002-193841

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502196050]

1. 変更年月日

2002年 5月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区大蔵2丁目10-1

氏 名

国立成育医療センター総長